

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann

Untersuchungen
über Mannosetransferase in
Dictyostelium discoideum

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Bauer, Ralf

Ebeleben/Thür.

1972

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann

**Untersuchungen
über Mannosetransferase in
Dictyostelium discoideum**



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Bauer, Ralf

Ebeleben/Thür.

Referent: Prof. Dr. H.-J. Risse

Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Schütte



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 31. 5. 1972

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit entstand in dem
Physiologisch-Chemischen Institut der
Freien Universität Berlin (Fachbereich 1)
auf Anregung und unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. H.-J. Risse.

Für die mir gewährte Hilfe und Unterstützung
danke ich Herrn Prof. Dr. Risse herzlich.

Ferner bin ich zu Dank verpflichtet:

Herrn Prof. Dr. H.-J. Merker,

Anatomisches Institut - FU Berlin,

für die Anfertigung der elektronen-
mikroskopischen Aufnahmen und

Frl. M. Rath für das Gewinnen und Züchten
der Amöben-Zellen.

Inhaltsverzeichnis

=====

1.	Einleitung	7
2.	Material und Methoden	
2.1	<u>Gewinnen und Züchten der Futterbakterien und Amöbenzellen</u>	12
2.11	Salmonella minnesota R 595	12
2.12	Dictyostelium discoideum M II	13
2.13	Dictyostelium discoideum Ax-2	15
2.2	<u>Isolierung der partikelgebundenen Mannosetransferase</u>	16
2.21	Fraktionierung der Dd-Zellen	16
2.22	Gradientenzentrifugation	17
2.3	<u>Standardversuchsansätze</u>	18
2.4	<u>Analytische Methoden</u>	18
2.41	Zucker- und Aminosäureanalysen	18
2.42	Chromatographische Methoden	19
2.421	Papierchromatographie	19
2.422	Gaschromatographie	20
2.423	Säulenchromatographie	21
2.43	Hochspannungselektrophorese	23
2.44	Reagenzien	23

3.	V e r s u c h e u n d E r g e b n i s s e	
3.1	<u>Transfer von Mannose auf</u> <u>Acceptorpartikel von Dd M II</u>	24
3.11	Einbau von Mannose in verschiedene Zellfraktionen	24
3.12	Standardbedingungen für den Mannoseeinbau:	28
3.121	Abhängigkeit von der Zeit	29
3.122	Abhängigkeit vom pH-Wert	32
3.123	Abhängigkeit von der Proteinkonzentration	33
3.13	Aktivität der Mannosetransferase während der Entwicklung der Dd-Zellen in der Submerskultur	34
3.2	<u>Untersuchungen über die Acceptorpartikel</u>	41
3.21	Elektronenoptische und spektrophotometrische Untersuchungen	41
3.22	Zucker- und Aminosäureanalysen	51
3.23	Kohlenhydrat-Eiweiß-Bindung	57
3.3	<u>Mechanismus des Mannose-Transfers</u>	59
3.31	Untersuchungen über die biphasische Einbaukinetik	59
3.32	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der zweiten Einbauphase	71
3.33	Versuche zur Isolierung des Zwischenprodukts	78
4.	D i s k u s s i o n	86
5.	Z u s a m m e n f a s s u n g	101
6.	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	104

A b k ü r z u n g e n

Adenosinmonophosphat	AMP
Desoxyribonukleinsäure	DNS
Dictyostelium discoideum Ax-2	Dd Ax-2
Dictyostelium discoideum M II	Dd M II
L-Fucose	Fuc
D-Glucose	Glc
Glutathion	GSH
Guanosindiphosho-fucose	GDP-Fucose
Guanosindiphosphomannose	GDP-Mannose GDP-Man
Impulse pro Minute	cpm
2-Keto-3-desoxyoctonsäure	KDO
Kohlenhydrat	KH
D-Mannose	Man
Perjodsäure-Schiff's-Reagenz	PAS
Ribonuklease	RNase
Ribonukleinsäure	RNS
Trichloressigsäure	TCE
Trimethylaminomethan	Tris
Uridindiphosphogalaktose	UDE-Galaktose
D-Xylose	Xyl

1. E i n l e i t u n g

Ein gutes biochemisches Modell zur Untersuchung spezifischer Zellaggregation stellt der zur Gruppe der kollektiven Amöben (Acrasina) gehörende Stamm *Dictyostelium discoideum* (Dd) dar (1,2). Dieser Stamm durchläuft in seinem Lebenszyklus alle Differenzierungsschritte von der Ein-Zell-Amöbe zum vielzelligen Gewebsverband. Die Entwicklungsstadien sind klar definiert und morphologisch faßbar; Zellen in diesen Stadien sind in ausreichendem Maße zu erhalten.

Dd bildet bei der Kultivierung auf Agarplatten Sporen, aus denen amöboid bewegliche Einzelzellen entstehen. Diese Einzelzellen vermehren sich durch Teilung, wobei ihnen Bakterien als Nahrung dienen. Sind alle Bakterien von den Amöben phagozytiert, so stellen die Amöben ihre Teilung ein. Die solitäre Entwicklungsphase ist damit beendet, und es kommt nun durch aktive Bewegung der Einzelzellen zur Aggregation. Dabei werden stabile interzelluläre Kontakte ausgebildet. Das Ergebnis dieser Zellaggregation sind vielzellige Verbände, die Pseudoplasmodien genannt werden. Im Zentrum eines Pseudoplasmodiums entsteht eine Erhebung, das Capitulum. Das Plasmodium formt sich zu einem gestreckten Körper, wobei das Capitulum die Spitze darstellt. Dieses morphologische Entwicklungsstadium der Amöbe wird als Conus bezeichnet. Der Conus wandert gewöhnlich eine Zeitlang auf dem Nährboden entlang, wird dann sesshaft und wandelt sich in

einen gestielten Fruchtkörper um, der Sporen bildet, aus denen wieder Ein-Zell-Amöben hervorgehen (3,4).

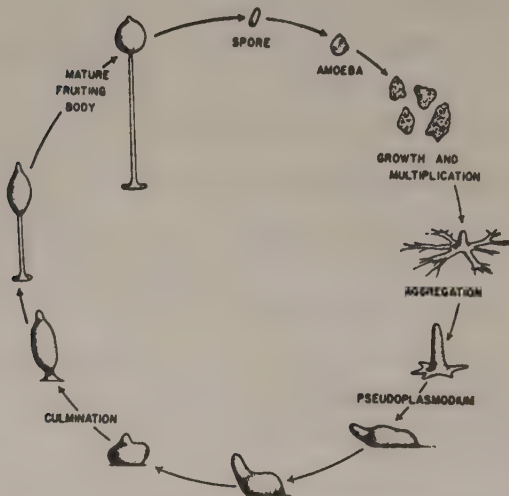


FIG. 1. Schematic diagram of the developmental cycle in *Dictyostelium discoideum*.

Abb. 1

Entwicklung des Amöbenstammes *Dictyostelium discoideum* (Ward, 1959)

Der Mechanismus, der aus dem Ein-Zell-Stadium einen lückenlosen, vielzelligen Verband entstehen läßt, beginnt mit einer chemotaktischen Orientierung der Zellen (5). Die treibende Kraft dabei ist ein Stoff, der zuerst bei den Dd-Zellen von Bonner (6) entdeckt wurde und der den Namen "Acrasin" erhielt. Heftman, Wright und Liddel isolierten einen Steroidkörper, ein 22 -stigmasten- β -ol, aus den Amöben, der Acrasinaktivität zeigte (7). Konijn et al. (8) dagegen spricht dem zyklischen AMP die Acrasinwirkung zu. Welchen chemischen Stoff man auch immer unter der Bezeichnung "Acrasin" zu verstehen hat, der eigentliche Beginn der Aggregation stellt somit in jedem Falle die Ausschüttung einer chemotaktischen Substanz dar. Damit sind die aggregationsreifen Zellen in zwei Punkten gegenüber den vegetativen Ein-Zell-Amöben ausgezeichnet:

1. Fähigkeit zur Acrasinsekretion,
2. Bildung von stabilen interzellulären Kontakten.

Will man weitere Unterschiede zwischen vegetativen und aggregationsreifen Zellen finden, so kann man einmal die Zusammensetzung von verschiedenen Substanzen, z.B. von Zuckern, in bestimmten Entwicklungsstadien bestimmen. Diesen Weg gingen Gerisch, Malchow, Lüderitz und Westphal (2,9,10). Sie fanden Glykoproteide in Zellmembranen von Dd, deren Polysaccharidteil aus Fucose, Mannose, Glucose und N-Acetylglucosamin bestand. Die Zuckerzusammensetzung der durch Phenol/H₂O-Extraktion isolierten Polysaccharide von aggre-

gationsreifen Zellen unterschied sich deutlich von den Polysacchariden aus vegetativen Amöben (9). Die Polysaccharide aus aggregationsreifen Amöben waren an der Oberfläche der Zellmembran lokalisiert, wie die Autoren mit der Immunofluoreszenzmethode nachweisen konnten (2). Außerdem ließen sich mit der Immunelektrophorese Unterschiede im Antigenmuster zwischen vegetativen und aggregationsreifen Zellen feststellen (11). Daß der Polysaccharidteil des Glykoproteids für die Präzipitationsmuster entscheidend war, konnten die Autoren durch Behandlung ihrer Antigenfraktion mit Perjodat aufdecken. Nur Perjodatbehandlung zerstörte die Präzipitationslinien, während alpha-Amylase und Pronase keinen Einfluß auf die serologische Reaktion hatten (12). Ein anderer Weg, um Unterschiede zwischen vegetativen und aggregationsreifen Zellen zu finden, besteht darin, das Enzymmuster von vegetativen und aggregationsreifen Zellen zu vergleichen. Wenn man nämlich annimmt, daß der Übergang von der Ein-Zell-Amöbe zum vielzelligen Verband mit dem Auftreten artspezifischer Zellkontaktstellen verbunden ist, so muß man fordern, daß beim Durchlaufen einzelner Entwicklungsstadien molekulare Unterschiede an der Zelloberfläche bestehen. Es müssen also entweder entsprechende Rezeptoren geschaffen werden, oder spezifische Bindungsstellen müssen verschwinden. Die Synthese oder der Abbau dieser Kontaktstellen wird durch das Auftreten bestimmter Enzyme gekennzeichnet sein. Die von Gerisch, Malchow und Lüderitz analysierten Glykoproteide werden auf der zytoplasmatischen Membran gefunden. Da der

Polysaccharidteil sich vor allem aus Fucose, Mannose, Glucose und N-Acetylglucosamin zusammensetzt, besteht die Möglichkeit, den Einbau eines dieser Zucker zu verfolgen. Glucose und N-Acetylglucosamin kommen in den verschiedensten Glykoproteiden vor, die Untersuchung über den unterschiedlichen Einbau dieser Zucker in Zellfraktionen wird daher ein unübersichtliches Ergebnis liefern. Fucose war bei Beginn der Arbeit als radioaktiver Nukleotidzucker nicht erhältlich. Es erschien deshalb sinnvoll, die Aktivität der Mannosetransferase während des Entwicklungsvorganges zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich

1. mit dem Einbau von D-Mannose in verschiedene Zellfraktionen,
2. mit der Abhängigkeit des Mannoseeinbaus von der Zeit und dem Entwicklungsstadium der Zellen, mit dem Auftreten einer hochaktiven Mannosetransferase im Zeitpunkt der Aggregation und ihrer Bedeutung für die Zellkontaktbildung,
3. mit der Charakterisierung dieses Enzyms, seines Substrates, der vorläufigen chemischen Struktur des Glykoproteids, in das Mannose eingebaut wird, und den subzellulären Partikeln, an denen möglicherweise die Glykoproteidsynthese stattfindet.

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnen und Züchten der Futterbakterien und Amöbenzellen

2.11 Salmonella minnesota R 595

Die Stammkultur der Futterbakterien S.minnesota R 595 wird bei 37°C auf Schrägagar gezüchtet. Für einen Liter Nährboden benötigt man:

Spezialpepton	(Merck)	15,6 g
Hefeextrakt		2,8 g
NaCl		5,6 g
Oxoid-Agar Nr.3		12,0 g
D-Glucose		1,0 g

Alle Substanzen bis auf Glucose werden auf einen Liter Wasser aufgefüllt und 20 Minuten bei 134°C autoklaviert. Anschließend wird die Glucose hinzugefügt und 30 Minuten bei 100°C nachsterilisiert. Der pH-Wert beträgt 7,5.

Zur Fütterung der Amöbenzellen Dd M II in der Submerskultur werden pro Gramm Amöbenzellen etwa 1,5 g Bakterien benötigt. Um eine entsprechende Menge Bakterien zu erhalten, werden die Bakterien von der Stammkultur mit einer Öse auf Röhrchen mit je 5 ml Fleischwasser-Glucose-Bouillon als Flüssigkeitsnährboden überimpft. Der Flüssigkeitsnährboden hat dieselbe Zusammensetzung wie der Schrägagar, nur fehlt der Zusatz des Oxoid-Agars Nr. 3. Die Röhrchen mit der Vorkultur werden 8-10 Stunden bei 37°C bebrütet. Danach werden jeweils 5 ml der Vorkultur in einem Liter Antibiotic Medium 3 auf-

geschwemmt. Diese Hauptkultur wird 12-14 Stunden bei 37°C geschüttelt. Nach dieser Zeit werden die Bakterien bei 5800 x g 30 Minuten lang abzentrifugiert, zweimal mit M/60 Phosphat-Puffer pH 6,0 gewaschen, in 50 ml M/60 Phosphat-Puffer pH 6,0 aufgenommen und eine Stunde bei 70°C im Wasserbad erhitzt. Um 12 Liter Amöben im aggregationsreifen Zustand zu gewinnen (entspricht ca. 30 g Zellen Feuchtgewicht), werden 18 Liter Bakterien-Hauptkultur benötigt (entspricht etwa 54 g Bakterienzellen).

2.12 Dictyostelium discoideum M II ⁺

Die Sporenköpfe der Amöben werden auf synthetischem Agar folgender Zusammensetzung bei 25°C gezüchtet (13):

15,0 g	Difco-Agar	
1,0 g	NH ₄ Cl	
0,13 g	MgSO ₄	(0,26 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O)
3,0 g	KH ₂ PO ₄	
6,0 g	Na ₂ HPO ₄	(7,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)
ad 1000 ml Wasser.		

Dieser synthetische Nährboden wird im Autoklaven bei 121°C 30 Minuten autoklaviert. Vor dem Gießen der Platten werden 4 g Glucose zugegeben und 30 Minuten bei 100°C nachsterilisiert. Der pH-Wert beträgt etwa 6,5.

Zur Anzucht der Amöben auf diesem Nährboden werden die Sporenköpfe in 5 ml M/60 Phosphat-Puffer pH 6,0 suspendiert.

⁺ Zur Verfügung gestellt von Dr. Gerisch, Max-Planck-Institut, Friedrich Miescher Lab. Tübingen.

Daneben werden ebenfalls in 5 ml M/6o Phosphat-Puffer pH 6,0 Bakterien aufgeschwemmt. Von der Amöben- und Bakteriensuspension werden je ein Tropfen auf die Platten gegeben, mit Spateln werden die Tropfen verteilt und die Platten bei 25°C bebrütet.

Zum Gewinnen der Amöben im vegetativen und aggregierenden Zustand werden die Amöben in der Submerskultur bei 25°C in einem M/6o Phosphat-Puffer pH 6,0, der pro Liter 0,1 mg Thiamin und 0,1 mg Pyridoxin enthält, unter ständigem Schütteln in einem Shaker (Gyrotory-Shaker, New Brunswick Scientific) gezüchtet. Um ca. 30 g Zellen im aggregationsreifen Zustand zu gewinnen, werden Dd-Sporenköpfe von ungefähr 7-8 gut bewachsenen Agarplatten benötigt. Die Dd-Sporenköpfe werden in 500 ml M/6o Phosphat-Puffer pH 6,0 aufgeschwemmt, anschließend werden die Vitaminlösung und die Bakteriensuspension dazugegeben. Dieser Ansatz wird 10 Minuten im Shaker geschüttelt. Danach wird die Kultur auf 12 Liter M/6o Phosphat-Puffer pH 6,0 gleichmäßig verteilt und 42 Stunden bei 25°C geschüttelt. Um Zellen im vegetativen Zustand zu gewinnen, wird die Anzucht in der Submerskultur entsprechend kürzer bemessen.

Zur Prüfung auf Aggregationsfähigkeit der Zellen wird folgender Test durchgeführt:

Ein Tropfen aus der Submerskultur wird auf einem Objektträger in einer Feuchtigkeitskammer (eine Petrischale, die ein mit Wasser getränktes Filterpapier enthält) 20 Minuten bei Zimmertemperatur bebrütet. Danach wird im Phasenkontrast-

mikroskop bei 320facher Vergrößerung kontrolliert, ob die Amöben zu dichten Zellhaufen aggregiert sind. Dieser Test ist notwendig, da die Zellen während der Anzucht in der Submerskultur durch die Rotation des Shakers mechanisch immer wieder getrennt werden und eine Aggregation unter dem Mikroskop direkt nach Entnahme aus der Submerskultur nicht zu sehen ist.

2.13 Dictyostelium discoideum Ax-2 (axenischer Stamm) ⁺

Die Anzucht des axenischen Stammes erfolgt in einer Hauptkultur-Nährlösung. Für einen Liter Nährlösung benötigt man nach Ashworth (14):

Oxid-Pepton	14,300 g
Oxid-Hefe-Extrakt	7,150 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	1,280 g
KH_2PO_4	0,486 g
D-Mannose	15,400 g
Streptomycin	0,050 g
Penicillin	0,030 g

Der pH-Wert beträgt 6,7.

Alle Substanzen außer Mannose, Streptomycin und Penicillin werden auf einen Liter Wasser aufgefüllt und 30 Minuten bei 120°C autoklaviert. Danach werden Mannose, Streptomycin und Penicillin steril abfiltriert und hinzugegeben. 5 ml dieser Nährlösung werden mit ca. drei Ösen voll gefriergetrockneter Amöben Dd Ax-2 beimpft. Bei 25°C wird diese Vorkultur 4-5 Tage angezüchtet. Die Vorkultur wird nicht geschüttelt. Ist

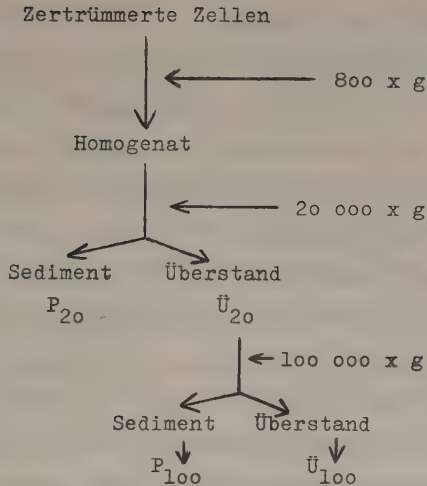
⁺ Diese Mutante wurde von Ashworth isoliert und von Dr. Gerisch/Tübingen zur Verfügung gestellt.

die Bewachung gut, so werden die 5 ml Vorkultur in einem Liter Hauptkultur-Nährlösung aufgeschwemmt. Diese Hauptkultur wird 3-4 Tage bei 25°C im Shaker gezüchtet. Nach dieser Zeit gewinnt man pro Liter ca. 10 g Zellen im vegetativen Stadium. Will man aggregationsreife Amöben des axenischen Stammes gewinnen, so müssen die vegetativen Zellen bei 500-600 x g abzentrifugiert, zweimal mit M/60 Phosphat-Puffer pH 6,0 gewaschen und anschließend 6-9 Stunden in M/60 Phosphat-Puffer pH 6,0 bei 25°C im Shaker geschüttelt werden. Nach dieser Zeit befinden sich die Zellen in der Aggregationsphase. Der Aggregationstest fällt positiv aus. Pro Liter Hauptkultur gewinnt man ca. 6 g Zellen im aggregationsreifen Stadium.

2.2 Isolierung der partikelgebundenen Mannosetransferase

2.21 Fraktionierung der Dd-Zellen

Nach 40 Stunden Bebrütung im Shaker befindet sich der Amöbenstamm Dd M II in der Aggregationsphase. Die Zellen werden von den Futterbakterien bei 500-600 x g abzentrifugiert und zweimal mit M/60 Phosphat-Puffer pH 6,0 gewaschen. Nach Zusatz von 0,05 M Tris-GSH 0,01 M pH 7,5 im Verhältnis 1:1,5 (Puffer zu Zellen) werden die Amöbenzellen unter sorgfältiger Kühlung 50 sec mit Ultraschall (Gerät Branson Sonifier B 12-Stufe 5,5, normal Tip) behandelt. Das Zertrümmern der Amöben wird im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Es wird so lange nachbeschallt, bis weniger als 5% ganze Zellen im Mikroskopfeld (320fache Vergrößerung) zu sehen sind. Die zertrümmerten Zellen werden mit Hilfe der Ultrazentrifuge fraktioniert, wie es das Schema zeigt.



P₂₀ und P₁₀₀ werden je einmal mit 0,01 M Tris/HCl pH 7,5 gewaschen. Alle Fraktionen werden bei 0°C gewonnen. Dieses Fraktionierungsschema gilt für Dd M II und Dd Ax-2.

2.22 Gradientenzentrifugation

Zur weiteren Trennung der 100 000 x g Partikel in Subfraktionen wurde P₁₀₀ in einem Saccharose-Dichtegradienten, der von 20-60% Gewicht/Volumen in 10%-Schritten anstieg, 15 Stunden lang bei 48 000 x g zentrifugiert. Die erhaltenen Banden wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen, einmal 3 Stunden bei 133 000 x g und einmal 90 Minuten bei 100 000 x g in 0,01 M Tris/HCl pH 7,5 gewaschen.

2.3 Standardversuchsansätze

Jeder Ansatz bestand aus Enzym und Acceptor (bezogen auf mg Protein pro ml der jeweiligen Fraktion), Puffer, Mg-Ionen und GDP-Mannose. Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert. Die Menge der einzelnen Bestandteile in μ Mol sowie das Gesamtvolumen des Ansatzes ist jeweils in der Legende der Abbildungen oder im Text angegeben. Der Einbau von Mannose wurde auf mg Protein bezogen. Zur Proteinbestimmung diente die Biuretprobe. Als Standard wurde Rinderserumalbumin benutzt.

Nach entsprechenden Zeiten wurde ein aliquoter Teil aus den Inkubationsansätzen entnommen, mit dem gleichen Volumen eiskalter 10%iger TCE versetzt und kalt abzentrifugiert (5 Minuten/3000 rpm). Das ausgefallene Protein wurde dreimal mit 600 μ l 5%iger TCE gewaschen, anschließend in 30 μ l 1 N KOH aufgenommen und auf 1,2 x 3,5 cm große Papierstreifen (Chromatographiepapier Fa. Macherey und Nagel MN 212) aufgetragen. Die Proben wurden so dann im Exsiccator über KOH getrocknet. Die Radioaktivität der Proben wurde im Beckman DPM-100 Flüssigkeitszähler gemessen, in einer Szintillationsflüssigkeit, die 4 g Omnifluor (NEN) auf einen Liter Toluol enthielt.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Zucker- und Aminosäureanalysen

Für Partialhydrolysen wurden die Fraktionen mit 1 N H_2SO_4 Endkonzentration 30 Minuten bei 100°C erhitzt, anschließend

mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ neutralisiert.

Für Zuckeranalysen wurden die Proben in zugeschmolzenen Röhrchen mit 2 N HCl Endkonzentration bei 100°C 12 Stunden lang hydrolysiert.

Nach Neutralisieren der Totalhydrolysate durch Ionenaustauscherchromatographie wurden die Zucker papier- und gaschromatographisch bestimmt (welche Methode und welches Laufmittel benutzt wurde, ist bei den entsprechenden Versuchen angegeben).

Für Aminosäureanalysen wurden die Proben in zugeschmolzenen Röhrchen, in denen die überstehende Luft gegen N_2 ausgetauscht worden war, mit 6 N HCl Endkonzentration 24 Stunden lang bei 120°C hydrolysiert. Die Totalhydrolysate wurden im Vakuum über KOH zur Trockene eingedampft. Die Aminosäuren wurden teils im zweidimensionalen Papierchromatogramm oder mittels der Hochspannungselektrophorese, teils im Mikro-Aminosäure-Analysator "Chromatocord" der Firma Labotron bestimmt.

2.42 Chromatographische Methoden

2.421 Papierchromatographie

In folgenden Laufmitteln, angegeben in Volumenverhältnissen, wurden Papierchromatogramme entwickelt:

Pyridin/Butanol/Wasser	5/6/5	(A)
Pyridin/Butanol/Wasser	4/6/3	(B)
Butanol/Eisessig/Wasser	5/1/2	(C)

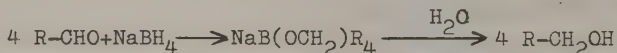
Äthylacetat/Butanol/Wasser/Eisessig	3/4/4/2,5	(D)
Butanol/Eisessig/Wasser	9/1/1	(E)
Amylalkohol/Pyridin/Wasser	3,5/3,5/3	(F)

Chromatogramme mit Laufmittel A,B,E und F liefen 40 Stunden als Durchflußchromatogramme, mit Laufmittel C und D 25 Stunden.

Chromatographiert wurde auf Papier der Firma Macherey und Nagel MN 212. Die Anfärbung der Zucker auf den Papierchromatogrammen erfolgte mit AgNO_3 in Aceton/methanolischem KOH, die Aminosäuren wurden mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Radioaktive Substanzen wurden mit einem Dünnschicht-Scanner (Berthold-Friesseke) verfolgt.

2.422 Gaschromatographie

Mit Hilfe der Gaschromatographie wurden die Zuckeralkohole als Acetylderivate bestimmt. Dazu wurden die Totalhydrolysate zur Trockene eingedampft. Jede Probe wurde mit 100 μl NaBH_4 von der Konzentration 10 mg/ml versetzt. Dabei wird die Carbonylgruppe der Zucker folgendermaßen umgesetzt:



Die Proben wurden über Nacht stehengelassen, dann wurde ein Tropfen Eisessig dazugegeben, um überschüssiges NaBH_4 zu zerstören. Die Na-Ionen wurden über Amberlite IR 120 H^+ entfernt. Danach wurden die Proben zweimal mit Methanol zur Trockene eingedampft. Dabei wird die Borsäure als leichtflüchtiger Borsäuremethylester abgezogen. Nun wurden 100 μl

Pyridin/Acetanhydrid 1/1 zugegeben. Bei 120°C wurde eine Stunde lang acetyliert. Danach wurden die Proben im Eisbad gekühlt, mit 0,5 ml Wasser und 1,0 ml Äthylacetat versetzt und geschüttelt, dabei gehen die acetylierten Zuckeralkohole in die Äthylacetatschicht. Nach kurzem Zentrifugieren (30 sec/1500 rpm) wurde die Äthylacetatschicht abgenommen. Die Wasserphase wurde noch zweimal mit Äthylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden einmal mit 0,5 ml Wasser gewaschen. Das Waschwasser wurde mit 0,5 ml Äthylacetat nachextrahiert. Danach wurden die Proben zur Trockene eingedampft und für die Gaschromatographie kurz vorher in einem bestimmten Volumen Äthylacetat gelöst.

2.423 Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde mit DEAE-Sephadex-A 25, Sephadex-G 10, DEAE-Cellulose und reiner Cellulose durchgeführt.

Die DEAE-Sephadex-A-25-Säule und die DEAE-Cellulose-Säule wurden mit einem linearen Salzgradienten steigender Molartität eluiert. Als Puffer diente Ammoniumbicarbonat von 0,01 M bis 0,3 M für die DEAE-Sephadex-A-25-Säule, Ammoniumbicarbonat von 0,1 M bis 0,3 M für die DEAE-Cellulose-Säule.

Die Ammoniumbicarbonatpuffer wurden folgendermaßen hergestellt:

0,01 M: 2 Liter Wasser wurden mit 1,67 ml 25%igen Ammoniak versetzt. Dann wurde CO₂ eingeblasen, bis

ein pH von 8,6 erreicht war.

0,1 M: 2 Liter Wasser wurden mit 16,7 ml 25%igem Ammoniak versetzt. Dann wurde CO_2 eingeblasen, bis eine pH von 8,6 erreicht war.

0,3 M: 2 Liter Wasser wurden mit 50,1 ml 25%igem Ammoniak versetzt. Dann wurde wie oben CO_2 eingeblasen, bis ein pH von 8,6 erreicht war.

Zum Eluieren der Säulen wurden 600 ml Puffer für die DEAE-Sephadex-A-25-Säule bzw. 800 ml für die DEAE-Cellulose-Säule benutzt, wobei das Mischgefäß 300 ml bzw. 400 ml Puffer der niedrigen Molarität enthielt und das Reservoirgefäß 300 ml bzw. 400 ml der hohen Molarität.

Vorbereitung der Säulen: DEAE-Sephadex-A 25 und DEAE-Cellulose wurden erst mit 0,5 N HCl versetzt, dann wurde mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen, anschließend mit 0,5 N NaOH und darauf wieder mit Wasser. Danach lief die DEAE-Sephadex-A-25-Säule mehrere Stunden mit 0,01 M NH_4HCO_3 , die DEAE-Cellulose-Säule mehrere Stunden mit 0,1 M NH_4HCO_3 . Die DEAE-Sephadex-A-25-Säule hatte die Maße 1,5 x 25 cm, die DEAE-Cellulose-Säule war 2 x 25 cm groß.

Sephadex-G 10: Zur Reinigung von X-Mannose (siehe Seite unten) diente eine 1,2 x 150 cm große Sephadex-G-10-Säule. Es wurde mit Wasser eluiert.

Cellulose p.A.: Zur weiteren Reinigung von X-Mannose wurde an einer 2,5 x 30 cm großen Säule, die mit Cellulose p.A. gefüllt war, chromatographiert. Eluiert wurde mit Äthylacetat/Butanol/Wasser/Eisessig 3/4/4/2,5. -

Bei allen Säulen wurden Fraktionen von etwa 2 - 2,5 ml gesammelt.

2.43 Hochspannungselektrophorese

Hochspannungselektrophoresen (Hölzel-Hochspannungselektrophorese) liefen in der Regel 20 Minuten bei 3000 Volt (50 Volt/cm) in Pyridin/Eisessig/Wasser 10/4/986, angegeben in Volumenverhältnissen, pH 5,3. Zur Auftrennung von Aminosäuren diente ein Ameisensäure/Eisessig/Wasser-Puffer 50/150/800, angegeben in Volumenverhältnissen, pH 1,8. Aufgetrennt wurde bei 3000 Volt (50 Volt/cm) eine Stunde lang auf Papier der Firma Macherey und Nagel MN 212.

2.44 Reagenzien

GDP-Mannose-C¹⁴ wurde teils von Radiochemical Centre Amersham (spezifische Aktivität 143 mCi/mM), teils von New England Nuclear (150,5 mCi/mM) bezogen.

Nichtmarkierte GDP-Mannose, Glutathion und L-Aminosäuren stammten von Boehringer, Mannheim. Die Zucker D-Xylose, L-Arabionse, L-Fucose, D-Mannose, D-Glucose, D-Ribose und D-Glucosamin lieferte die Firma Serva, Heidelberg.

3. Versuche und Ergebnisse

3.1 Transfer von Mannose auf Acceptorpartikel von Dd M II

3.11 Einbau von Mannose in verschiedene Zellfraktionen

Wenn die Übertragung eines Zuckers auf eine polymere Struktur in vitro gelingen soll, so sind für diese Transfer-Reaktion folgende Komponenten notwendig:

1. Der Ansatz muss einen hochmolekularen Acceptor enthalten, der eine freie Stelle für den Einbau eines bestimmten Zuckers aufweist.
2. Der Zucker braucht zu seiner Übertragung eine aktive Transferase.
3. Der zu übertragende Zucker muss in einer energiereichen Form vorliegen, d.h. im allgemeinen als Nukleotidvorstufe.
4. Viele Enzyme benötigen zweiwertige Kationen zu ihrer Aktivierung. Im Falle der Mannosetransferase handelt es sich um Mg^{2+} . Der Zusatz von Mg^{2+} steigert die Aktivität der Transferase beträchtlich oder ermöglicht sie erst.

Auf Grund dieser Überlegungen wurde nun geprüft, in welchen Fraktionen eine Enzymaktivität vorhanden ist.

Folgende Fraktionen wurden auf Transfer-Fähigkeit untersucht:

1. Homogenat,
2. bei 20 000 x g sedimentierende Partikel,

3. bei 100 000 x g sedimentierende Partikel,
4. partikelfreier 100 000 x g Überstand.

Jeder Inkubationsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 650 μ l: 2 mg Protein; $0,1555 \cdot 10^{-2}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14} ; 14 μ Mol Mg^{2+} ; 47,4 μ Mol Tris/HCl pH 7,5. Inkubiert wurde bei 37°C eine Stunde lang. Das Ergebnis dieses Ansatzes ist in Tab. 1 dargestellt.

	Homogenat	P ₂₀	P ₁₀₀	Ü ₁₀₀
Einbaurate	±	+++	+++	-

Tab. 1

Die höchsten Einbauraten in ein TCE-fällbares Protein werden in P₂₀ und in P₁₀₀ gefunden. Da P₂₀ und P₁₀₀ durch fraktionierte Zentrifugation aus dem Homogenat gewonnen werden, lässt sich die niedrige Aktivität des Homogenats durch die Anwesenheit GDP-Mannose-spaltender Enzyme erklären. Die Inkubation von GDP-Mannose mit Ü₁₀₀ allein liefert keinen Einbau. Da P₂₀ und P₁₀₀ den partikulären Anteil des Homogenats darstellen, Ü₁₀₀ dagegen nur die löslichen Enzyme des Homogenats enthält, muß der Einbau in P₂₀ und in P₁₀₀ durch eine partikelgebundene Mannosetransferase erfolgen, die Mannose auf den hochmolekularen Acceptor überträgt. In Ü₁₀₀ befindet sich kein Acceptor, so daß auch kein Einbau gemessen werden kann. Alle weiteren Versuche gehen nun ausschließlich von der 100 000 x g Fraktion aus.

Es war nun von Interesse, ob sich die Fraktion P_{100} in Subfraktionen auftrennen läßt und ob gleichzeitig damit eine Anreicherung der Enzymaktivität gewonnen werden kann. Es wäre denkbar, daß Acceptor- und Transferaseaktivität nicht an der gleichen morphologischen Struktur lokalisiert sind, aber beide bei 100 000 x g sedimentieren. Bei einer weiteren Fraktionierung von P_{100} müßte sich ein Verlust der Einbaufähigkeit des Transferasesystems bemerkbar machen. Dieser Verlust wäre dann durch Kombination der Subfraktionen von P_{100} rückgängig zu machen. Zu diesem Zwecke wurde P_{100} mit Hilfe eines Saccharose-Dichtegradienten weiter aufgetrennt. Bei dieser Auftrennung gewinnt man vier Subfraktionen von P_{100} .

Saccharose- konzentration	20-25%	25%	35-40%	40-45%
Subfraktion	G_1	G_2	G_3	S

Tab. 2

Jede dieser Subfraktionen wurde durch eine Einbaukinetik auf ihre Fähigkeit zur Mannoseübertragung geprüft.

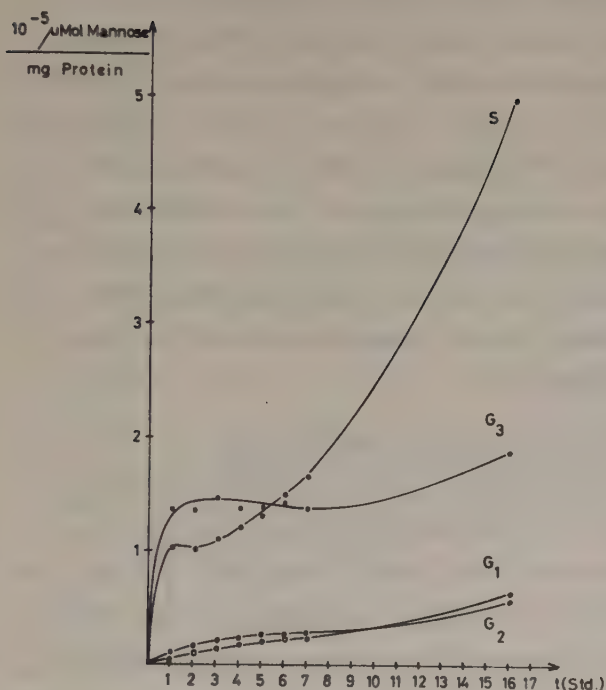


Abb. 2

Transferaseaktivität der durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen Subfraktionen von P_{100} aus Dd M II.

Die Inkubationsansätze enthielten:

G_1 : 2,9 mg Protein; $3,95 \cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose;
19,5 μ Mol Mg^{2+} ; 37,9 μ Mol Tris/HCl pH 7,5

G_2 : 3,14 mg Protein; GDP-Mannose, Mg^{2+} und Puffer entsprachen dem Ansatz G_1

G_3 : 3,41 mg Protein; GDP-Mannose, Mg^{2+} und Puffer entsprachen dem Ansatz G_1

S: 2,94 mg Protein; GDP-Mannose, Mg^{2+} und Puffer entsprachen dem Ansatz G_1

Gesamtvolumen der Ansätze 520-710 μ l.

Die Subfraktionen G_1 und G_2 bauen sehr wenig Mannose ein. Einen höheren Einbau erhält man mit G_3 . Eine sehr hohe Transferaseaktivität weist die 40-45%-Bande auf. In dieser Subfraktion findet man das gesamte mannosetransferierende System. Es ist nicht gelungen, Acceptor und Transferase über einen Saccharosegradienten zu trennen. Man kann deshalb annehmen, daß Acceptor und Transferase Bestandteil der gleichen morphologischen Strukturen sind. Bei dieser Fraktionierung gelang es, die Enzymaktivität auf über das 25fache anzureichern.

3.12 Standardbedingungen für den Mannoseeinbau

Damit die weiteren Versuche unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden können, wurde die Abhängigkeit des Mannoseeinbaus von verschiedenen Parametern bestimmt. Jede enzymatische Reaktion hängt von folgenden Größen ab:

1. Die Enzymaktivität für eine gegebene Substratkonzentration richtet sich nach dem Dissoziationsgrad des Enzymproteins, ist somit direkt vom pH-Wert des Puffers, in dem die Reaktion ablaufen soll, abhängig.
2. Die Menge an umgesetzter GDP-Mannose bzw. die Größe des Mannoseeinbaus hängt für eine gegebene Substratkonzentration von der Inkubationszeit und der vorhandenen Enzymmenge ab.
3. Die Menge des umgesetzten Substrates hängt von der Affinität des Enzyms zu seinem Substrat ab. Diese Affinität

wird mittels der Michaelis-Menten-Konstanten bei verschiedenen Substratkonzentrationen, aber gleicher Enzymkonzentration bestimmt (über die K_m -Bestimmung siehe 3.32).

4. Häufig findet man auch eine Abhängigkeit des Einbaus von der Konzentration bestimmter Aktivatoren. In diesem Falle ist die Magnesiumionenkonzentration für die Enzymaktivität bestimmend.

Es soll jetzt die Abhängigkeit des Mannose-Transfers von der Inkubationszeit, vom pH-Wert der Lösung und von der Enzymkonzentration (bezogen auf Proteinkonzentration) untersucht werden. Eine Aktivitätsabhängigkeit der Mannosetransferase von der Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Konzentration wird zur Zeit von cand.med.Rothe untersucht.

3.121 Abhängigkeit von der Zeit

Ein üblicher Ansatz wurde bei $37^{\circ}C$ über fünf Stunden inkubiert.

Das Ergebnis dieser Einbaukinetik ist in Abbildung 3 dargestellt.

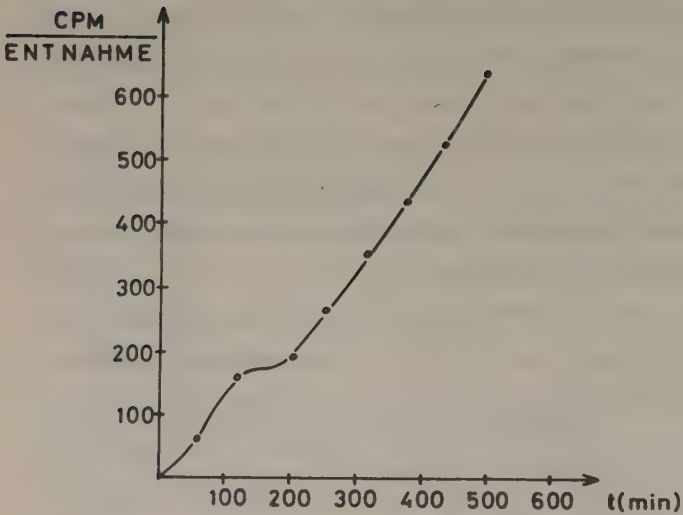


Abb.3

Abhängigkeit des Mannosetransfers von der Zeit

Der Ansatz enthielt:

7,8 mg Protein; 200 μ Mol Tris/HCl pH 7,5; 20 μ Mol Mg^{2+} ;
 7,8 $\cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14} ; Gesamtvolumen 2490 μ l.

Die Kurve zeigt, daß der Einbau von Mannose über die Zeit stark zunimmt. Um auszuschließen, daß der steile Einbau nach etwa vier Stunden auf eine Verunreinigung durch Bakterien oder Pilze zurückgeführt werden muß, die in dieser Zeit auskeimen könnten, wurde der Zeitversuch über 16 Stunden unter völlig sterilen Bedingungen durchgeführt. Dabei war die gesamte Aufarbeitung der Amöben, das Gewinnen der einzelnen Fraktionen und der Ansatz steril. Dieser Sterilversuch lieferte das gleiche Ergebnis.

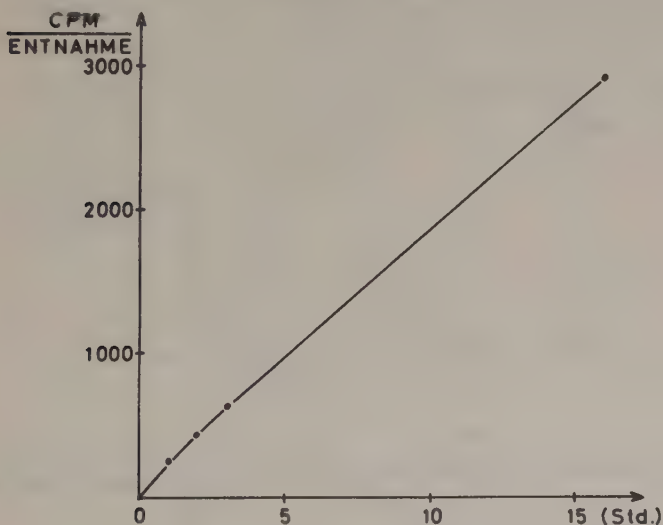


Abb. 4

Mannosetransfer über die Zeit unter sterilen Bedingungen
Der Ansatz enthielt:

10 mg Protein; 47,7 μ Mol Tris/HCl pH 7,5; 20 μ Mol Mg^{2+} ;
 $0,98 \cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14} ; Gesamtvolumen 680 μ l.

3.122 Abhängigkeit vom pH-Wert

Die folgende Abbildung beschreibt die pH-Abhängigkeit des Enzyms.

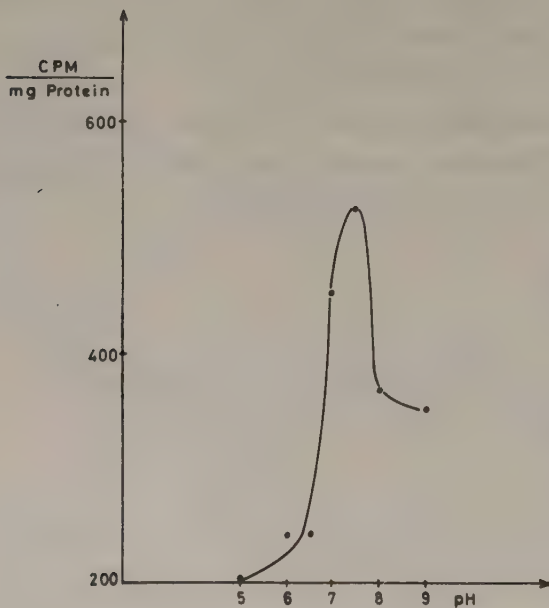


Abb. 5

Aktivität der Mannosetransferase bei verschiedenen pH-Werten

Jeder Ansatz enthielt:

7,5 mg Protein; 30 μ Mol Mg^{2+} ; $0,98 \cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14} ; 70 μ Mol Tris-Puffer, der mit HCl auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt war.

Gesamtvolumen ca. 1170 μ l.

Jeder Ansatz wurde bei 37°C 20 Stunden lang inkubiert.

Der pH-Wert von 7,5 ist für die Mannosetransferase optimal. Erstaunlich ist, daß die Amöben in einem Puffer von pH 6-6,5 wachsen, während die Aktivität der Mannosetransferase bei pH 7,5 liegt.

3.123 Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Als nächstes sollte die Abhängigkeit des Mannosetransfers von der Enzymmenge untersucht werden. Da die Mannosetransferase aber nicht in gereinigter Form vorliegt und sie außerdem partikelgebunden ist, kann nur eine Aussage über die günstigste Proteinkonzentration von P_{100} im Versuchsansatz gemacht werden, mit der ein optimaler Mannoseeinbau erzielt wird.

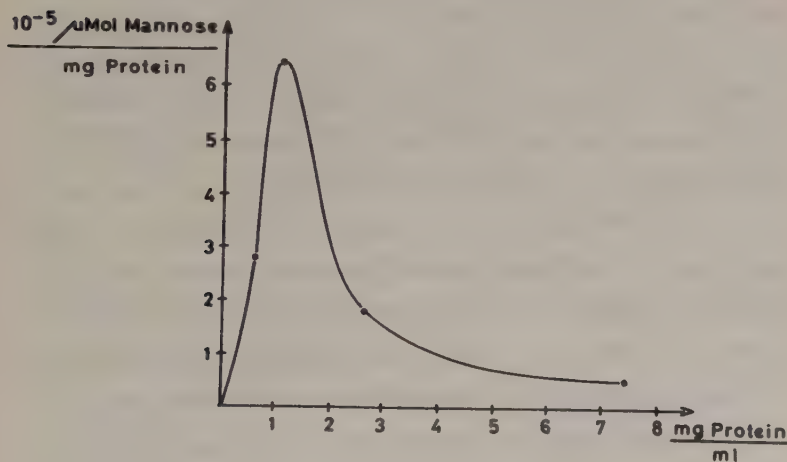


Abb.6

Aktivität der Mannosetransferase bei verschiedener Proteinkonzentration

Jeder Ansatz enthielt:

48 μ Mol Tris/HCl pH 7,5; 35 μ Mol Mg^{2+} ; $6,22 \cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14} . Die Proteinkonzentration variierte von 0,596-7,40 mg/ml, das Gesamtvolumen von 575-955 μ l. Inkubiert wurde 5 Std. lang bei 37°C.

Wie aus dem Versuchsergebnis zu sehen ist, liegt die günstigste Proteinkonzentration bei 1-1,5 mg/ml. Je höher die Proteinkonzentration ist, desto schlechter wird Manno- se auf den Acceptor übertragen. Anscheinend kommt es bei höheren Proteinkonzentrationen im Ansatz zur Aggregation der Partikel, so daß mit höheren Proteinmengen kein opti- maler Mannoseeinbau mehr zu erzielen ist.

3.13 Aktivität der Mannosetransferase während der Entwicklung der Dd-Zellen in der Submerskultur

Als nächstes sollte geklärt werden, ob diese Mannosetrans- ferase in einer Beziehung zur Zellaggregation steht. Osborn und Sussman (15) hatten bereits 1964 gezeigt, daß gleich- zeitig mit dem Auftreten eines galaktosehaltigen Mukopoly- saccharids zum Zeitpunkt des migrierenden Pseudoplasmodiums eine Synthese bzw. Aktivierung einer Galaktosetransferase stattfindet, die Galaktose aus UDP-Galaktose auf das Muko- polysaccharid überträgt. Wenn Mannose Bestandteil der Struk- turen ist, die der Amöbe den kollektiven Zusammenschluss er- möglicht und wenn diese Strukturen Bestandteil der 100 000- x-g-Fraktion sind, so sollte eine verstärkte Inkorporation von Mannose in P_{100} im Zeitpunkt der Aggregation gemessen werden können. Zu diesem Zwecke wurde die vegetative und

aggregationsreife Entwicklungsphase der Dd-Zellen in der Submerskultur in "Entwicklungsstadien" I-VII unterteilt. Verschiedene Entwicklungsstadien kennzeichnen hier eine verschieden lange Anzuchtzeit in der Submerskultur. Die Abnahme der Futterbakterien *S. minnesota* in der Kultur während der Shakerbebrütung wurde verfolgt. Dazu wurden in den entnommenen Proben die Amöbenzellen bei 500-600 x g 15 Minuten lang abzentrifugiert. Die Extinktion des bakterienhaltigen Überstandes bei 600 m μ war ein Maß für die Abnahme der Bakterien in der Submerskultur. In jedem Entwicklungsstadium, in dem sich die Amöben bei der Entnahme befanden, wurde die Fähigkeit der Dd-Zellen zur Aggregation geprüft. Aus folgenden Entwicklungsstadien wurden die 100 000 x g Partikel isoliert:

Entwicklungs- stadium	Stunden nach Be- ginn der Shaker- bebrütung	E ₆₀₀	Aggre- gation
I	24	2,048	Ø
II	28	1,830	Ø
III	32	0,980	Ø
IV	36	0,255	+
V	40	0,070	+++
VI	45	0,000	Ø
VII	48	0,000	Ø

Tab. 3

In jedem Entwicklungsstadium wurde das Ausmaß des Manno-
se-Transfers in P_{100} gemessen. Das Ergebnis dieses Stadien-
versuches zeigt Abbildung 7.

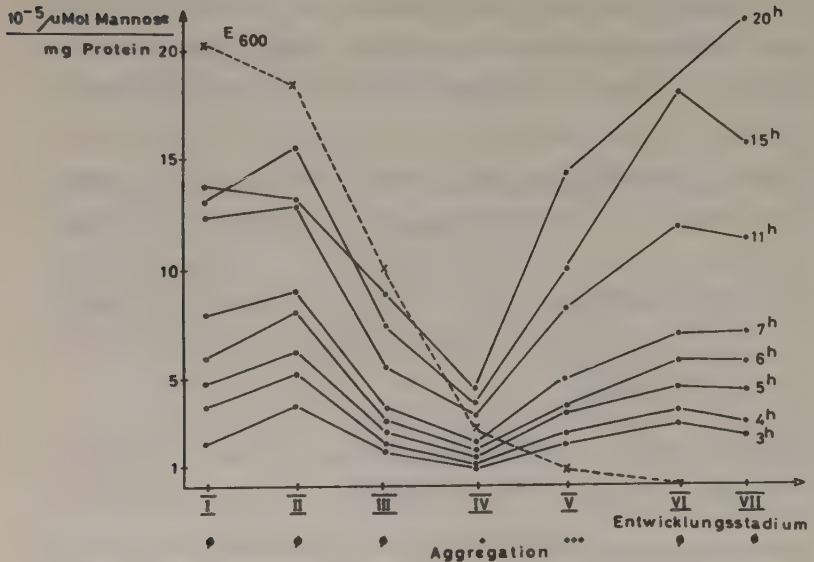


Abb. 7

Transferaseaktivität der 100 000 x g Partikel in Abhängig-
keit vom Entwicklungsstadium der Dd-Zellen bei verschiede-
nen Inkubationszeiten.

Die gestrichelte Kurve stellt die Abnahme der Futterbakte-
rien in der Submerskultur dar, verfolgt durch die Abnahme
der Extinktion bei 600 m/μ.

Jeder Ansatz enthält:

3 mg Protein; 48 μMol Tris/HCl pH 7,5; 3,5 μMol Mg^{2+} ;
 $6,38 \cdot 10^{-3}$ μMol GDP-Mannose- C^{14} ; $48 \cdot 10^{-3}$ μMol nichtmarkierte
GDP-Mannose. Das Gesamtvolumen betrug 640-730 μl.

Zu Beginn der vegetativen Phase - d.h. zu dem Zeitpunkt, an dem erstmalig eine genügend große Menge Zellen geerntet werden kann - ist der Mannoseeinbau relativ hoch. Diese Aktivität nimmt im Laufe der Vermehrung der Zellen mit der Abnahme der Bakterien rasch ab. Im Zeitpunkt der beginnenden Aggregation ist sie kaum noch meßbar. Die Kurvenschar der Isochronen - d.h. gleiche Inkubationszeit, aber verschiedene Entwicklungsstadien - strebt kurz vor der Aggregation dem Nullpunkt zu. Mit der Zunahme der Aggregationsfähigkeit jedoch steigen die Einbauraten und damit auch die Isochronenschar sprunghaft an. Der Mannoseeinbau ist somit abhängig vom Entwicklungsstadium, in dem sich die Dd-M-II-Zellen befinden.

Der erste Abschnitt der Stadienkurve scheint mit der Abnahme der Bakterien in der Submerskultur parallel zu gehen. Kontinuierlich sinkt der Mannoseeinbau in P_{100} bis zum Eintritt der Aggregation.

Es sah so aus, als ob die Isochronenschar aus zwei verschiedenen Kurven bestehen würde. Danach würde der erste Schenkel den Mannoseeinbau durch die anfangs in Mengen vorliegenden Salmonellen darstellen. Im Laufe der vegetativen Phase der Dd-M-II-Zellen werden die Bakterien phagozytiert, und es kommt zur Abnahme der Bakterien. Damit würde der Mannosetransfer durch die Bakterienenzyme sinken. Mit dem Einsetzen der Aggregation würden die Amöbenenzyme aktiv werden. Der zweite Teil der Kurve würde so-

mit den wahren Mannoseeinbau durch Amöbenenzyme repräsentieren.

Um zu entscheiden, ob die gewonnene Stadienkurve allein auf den Amöbenenzymen beruht oder ob die Isochronenschar als Summe zweier Kurventeile anzusehen ist, galt es, folgende Frage zu klären:

1. Besitzen die Salmonellen nach der üblichen Vorbehandlung (1 Stunde 70°C) die Fähigkeit, Mannose zu transferieren?
2. Besteht die Möglichkeit, eine Stadienkurve ohne die Anwesenheit von Futterbakterien zu gewinnen?

Salmonella minnesota R 595 wurde nun wie die Amöbenzellen aufgearbeitet und fraktioniert. Allerdings ließ sich keine P_{100} -Fraktion gewinnen. 0,5 mg Protein der P_{20} -Fraktion der Salmonellen wurde mit 24,2 μMol Tris/HCl pH 8,0; 1,5 μMol Mg^{2+} und $1,09 \cdot 10^{-3}$ μMol GDP-Mannose- C^{14} 16 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Der Einbau betrug 62 000 cpm/mg Protein. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da weder die Mutante R 595 noch der entsprechende Wildstamm einen Einbau von Mannose in den spezie-spezifischen Bereich des Polysaccharidanteils des *Salmonella*-O-Antigens katalysiert (27,39). Zur Überprüfung der Mannosetransferase in den Bakterien wurde ein derartiger Einbauansatz mit Phenol/ H_2O extrahiert. Dabei gehen 83 % der Radioaktivität in die Phenolphase und die Zwischenschicht. Wäre Mannose in die Zellwand-Antigen-

fraktion eingebaut worden, so hätte man die Radioaktivität in der wässrigen Phase finden müssen. Mit diesem Ergebnis ist aber der erste Schenkel der Stadienkurve immer noch nicht geklärt. Eine Lösung brachte die zweite Frage. Es besteht tatsächlich die Möglichkeit, die Aggregation der Amöbenzellen in Abwesenheit von Futterbakterien zu studieren. Der von Ashworth zur Verfügung gestellte Stamm Dd Ax-2 aggregiert in einem M/6o-Phosphat-Puffer ohne Bakterienzusatz (siehe unter 2.13). Nach etwa 7-8 Stunden Anzucht im M/6o Phosphat-Puffer fällt der Test auf Aggregation bei den Dd-Ax-2-Zellen positiv aus. Es wurden 15 000 x g Partikel im vegetativen Stadium und nach 2,7,23 und 30 Stunden Bebrütung im M/6o Phosphat-Puffer isoliert. Die Abbildung 8 zeigt, daß der Einbau von GDP-Mannose-C¹⁴ bei den Dd-Ax-2-Zellen während verschiedener Entwicklungsstadien ebenso verläuft wie der Einbau in die Dd-M-II-Zellen. Es besteht kein Unterschied, ob die Stadienkurve mit einem Amöbenstamm gewonnen wird, der mit Bakterien gefüttert, zur Aggregation gebracht werden kann, oder ob es sich um einen axenischen Stamm handelt.

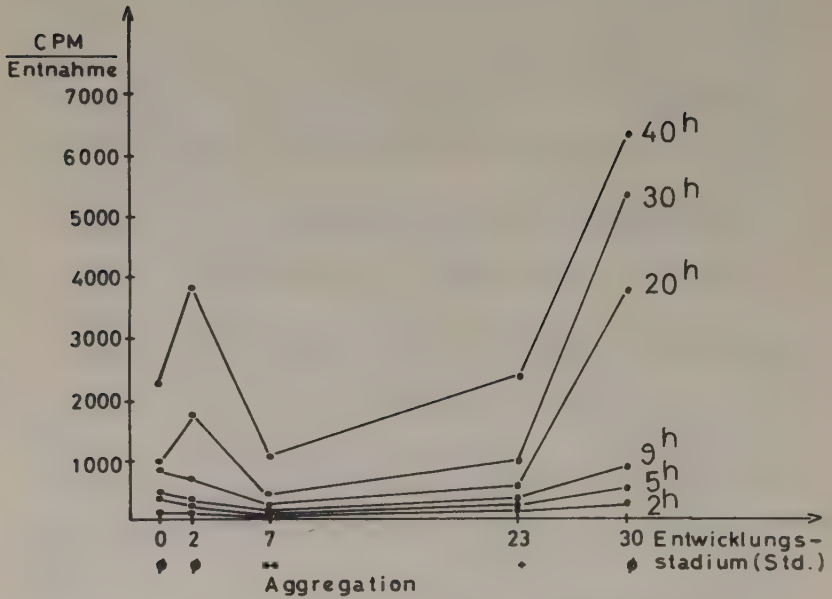


Abb. 8

Transferaseaktivität der 15 000 x g Partikel eines axenischen Stammes in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Dd-Ax-2-Zellen bei verschiedenen Inkubationszeiten

Jeder Ansatz enthielt:

3 mg Protein; 150 μ Mol Tris/HCl pH 7,5; 8,8 μ Mol Mg^{2+} ; 7 $\cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14} . Das Gesamtvolumen betrug 1780-1920 μ l.

3.2 Bisherige Untersuchungen über die Acceptorpartikel

Die Frage, die jetzt auftrat, hieß: Was enthält diese P_{100} -Fraktion, d.h. an welchen Subfraktionen der Zelle spielen sich die Einbaureaktionen tatsächlich ab?

Mannose wird sicherlich in den KH-Teil eines Glykoproteids eingebaut. Zur Synthese des Proteinteils des Glykoproteids sind in jedem Falle Ribosomen notwendig. An welchen subzellulären Einheiten aber die Synthese des KH-Teiles erfolgt und wo die Verknüpfung von Protein und KH-Teil zum fertigen Glykoproteid stattfindet, ist nicht sicher bekannt. Zwei Möglichkeiten kommen in Frage. Einmal kann der KH-Teil ebenso wie der Proteinteil an den Ribosomen synthetisiert werden. Zum anderen kann der KH-Anteil nach Fertigstellen des Proteins an einer anderen Struktur der Mikrosomenfraktion ansynthetisiert werden. Schließlich könnte P_{100} auch Bruchstücke der äußeren Zellmembranen enthalten, an denen sich der Mannosetransfer vollzieht.

In den Versuchsansätzen wird Mannose von einer aktiven Vorstufe aus auf einen fertigen Acceptor übertragen. Die Aktivität dieses Transfer-Systems ließ sich durch Trennung von P_{100} in Subfraktionen im Saccharose-Dichtegradienten beträchtlich steigern. Wenn man jetzt diese Subfraktionen hinsichtlich ihrer morphologischen Strukturen untersucht, so sollte man Hinweise über den Acceptor und den subzellulären Ort, an dem die KH-Synthese stattfindet, erhalten.

3.21 Elektronenoptische und spektrophotometrische Untersuchungen

Zuerst wurden die Subfraktionen G_1 , G_2 , G_3 und S spektrophotometrisch untersucht.

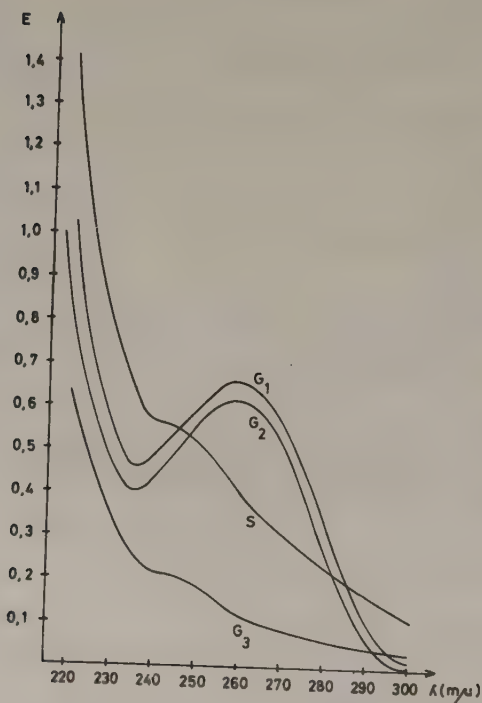


Abb.9

UV-Spektren der Subfraktionen von P_{100}

Zum Aufnehmen der UV-Spektren wurden ca. 50 µg Protein jeder Fraktion in je 1 ml 0,1 N KOH gelöst.

Die UV-Spektren von G_1 und G_2 zeigen ein reines Nukleinsäurespektrum. In diesen Banden liegen die gesamte DNS und RNS von P_{100} . Die 40-45%-Bande ist praktisch frei von Nukleinsäuren. Die Hauptmenge der Ribosomen findet man also in den leichteren Fraktionen. Das ist ein Hinweis darauf, daß der mannoseenthaltende KH-Anteil des Glykoproteids wahrscheinlich nicht an den Ribosomen synthetisiert wird. Zwei weitere Befunde schlossen die Beteiligung der Ribosomen an der Synthese der KH-Bestandteile ebenfalls aus. Wird ein üblicher Inkubationsansatz von S mit GDP-Mannose unter gleichzeitiger Zugabe von RNase angesetzt, so zeigt dieser Versuch denselben Mannoseeinbau wie ein Kontrollversuch ohne RNase.

Die in Abbildung 10 dargestellten Kurven geben das Ergebnis dieses Versuches wieder.

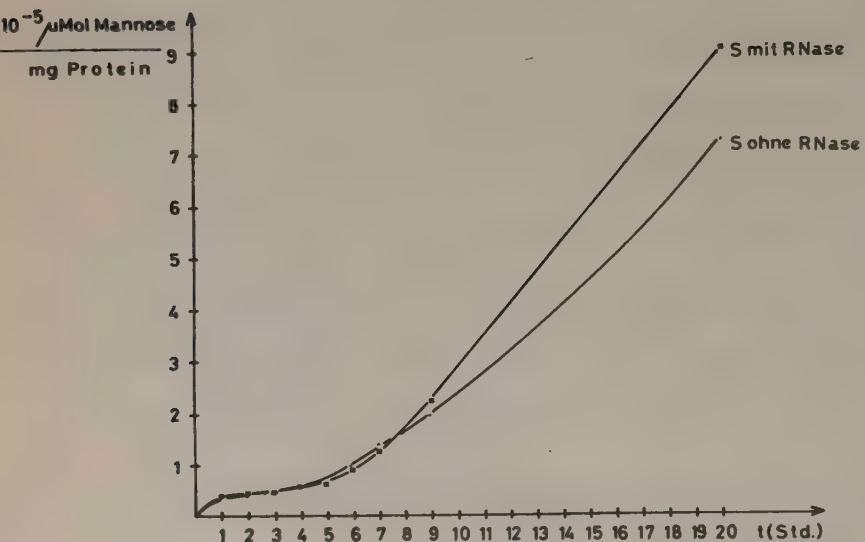


Abb. 10

Mannosetransfer in Gegenwart von RNase

Der Ansatz $S_{\text{mit RNase}}$ enthielt: 4,9 mg Protein; 24,2 μMol Tris/HCl pH 7,5; 35 μMol Mg^{2+} ; $5,44 \cdot 10^{-3}$ μMol GDP-Mannose- C^{14} ; 0,1 mg RNase; Gesamtvolumen 610 μl .

Der Kontrollversuch $S_{\text{ohne RNase}}$ hatte dieselbe Zusammensetzung wie der Ansatz $S_{\text{mit RNase}}$, nur fehlte das Enzym RNase.

Der andere Befund ist folgender: Man erhält bei der Ultraschallbehandlung immer teilweise abgelöstes Enzym im partikelfreien Überstand, und es gelingt, mit Hilfe dieser Enzymlösung Mannose in die P_{100} -Fraktion, die zuvor 3 Minuten lang bei 100°C erhitzt war, einzubauen.

Ansatz I

Ansatz II

Einbau: 1364 cpm/mg Protein 720 cpm/mg Protein

Tab. 4

Ansatz I enthielt: 2 mg Protein P_{100} ; 47 μMol Tris/HCl pH 7,5; 20 μMol Mg^{2+} ; $1,5 \cdot 10^{-3}$ μMol GDP-Mannose- C^{14} ; Gesamtvolumen 560 μl .

Ansatz II enthielt: 2 mg Protein P_{100} , das 3 Minuten bei 100°C erhitzt war; 2 mg Protein U_{100} ; 38,3 μMol Tris/HCl pH 7,5; 20 μMol Mg^{2+} ; $1,5 \cdot 10^{-3}$ μMol GDP-Mannose- C^{14} ; Gesamtvolumen 630 μl .

Der Versuch zeigt, daß die Struktur, die in P_{100} als Acceptor fungiert, mindestens hinsichtlich ihrer Acceptorfunktion, hitzestabil ist. Wären die Ribosomen in P_{100} an dem Mannosetransfer beteiligt, so hätte weder ein RNase-resistenter Mannoseeinbau noch ein hitzestabiler Acceptor auftreten dürfen.

Um die morphologischen Strukturen, an denen der Mannoseeinbau stattfindet, zu erkennen, wurden die Subfraktionen G_1 , G_2 , G_3 und S elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei findet man, daß tatsächlich nur in den beiden leicht-

ten Fraktionen Ribosomen in größerer Menge auftreten, während die schweren Fraktionen vorwiegend aus membranähnlichen Strukturen bestehen. Zum Vergleich ist eine ebenfalls sehr aktive mannoseeinbauende Fraktion aus P_{20} dargestellt. Diese Fraktion wurde als 50%-Saccharosegradienten-Bande bei 12 000 x g gewonnen. Sie zeigt ähnliche membranoide Elemente.

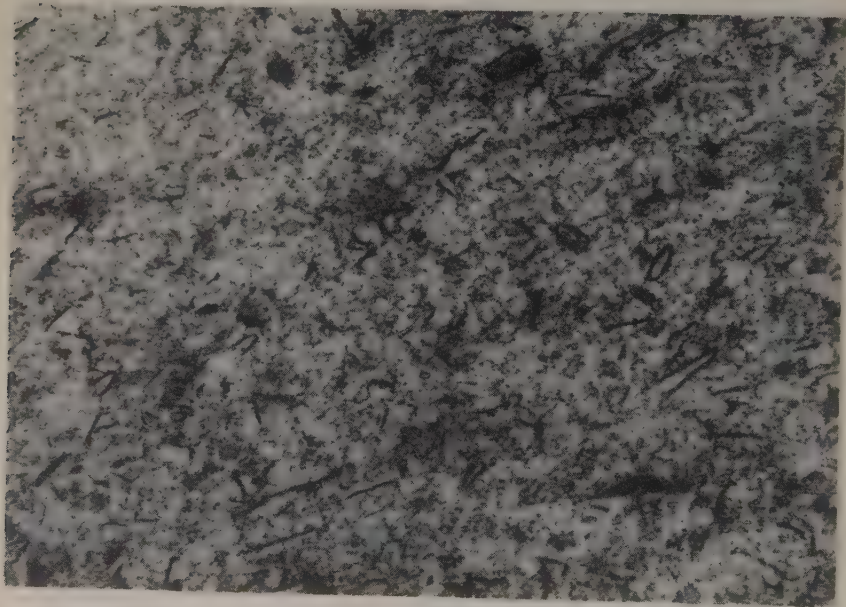


Abb.11 a

20-25%-Saccharosebande aus P_{100} ; Vergrößerung 23 000 x 3,5; die Präparate wurden mit 3,5%igem Glutaraldehyd in 0,2 M Na-Cacodylatpuffer pH 7,3 fixiert, mit 1%igem Osmiumtetroxid in 0,2 M Na-Cacodylatpuffer pH 7,3 kontrastiert.

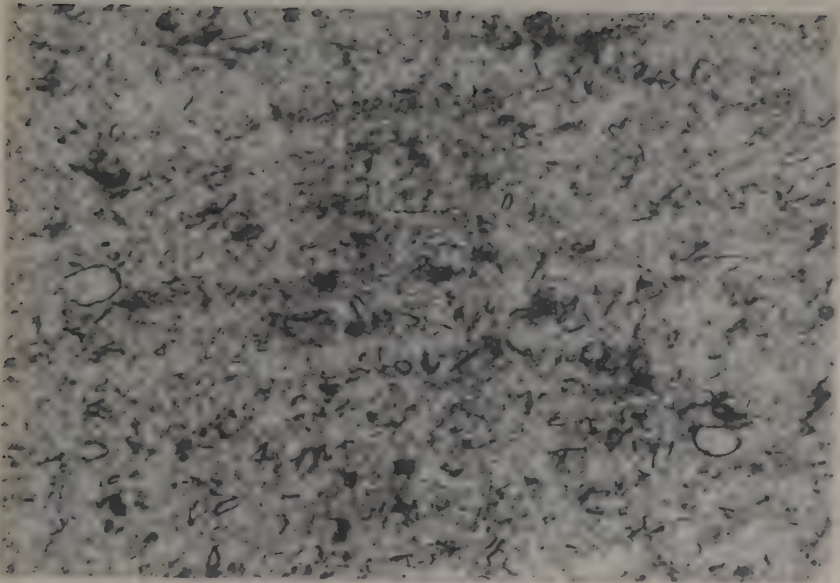


Abb.11 b
25%-Saccharosebande aus P_{100} ; Vergrößerung 16 000 x 3,5;
das Präparat wurde ebenso behandelt wie das Material
in Abbildung 11 a.



Abb.11 c

35-40%-Saccharosebande aus P_{100} ; Vergrößerung 19 000 x 3,5;
das Präparat wurde ebenso behandelt wie das Material
in Abbildung 11 a.

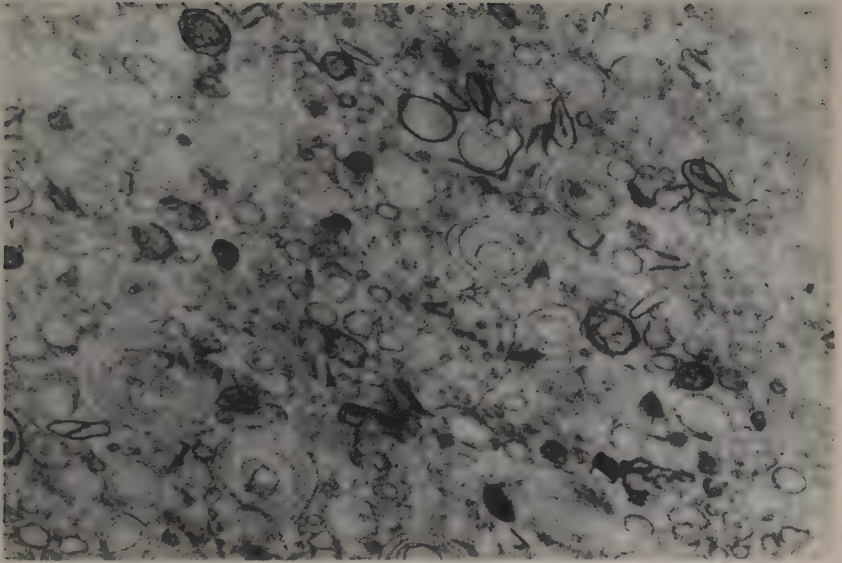


Abb.11 d

45%-Saccharosebande aus P_{100} ; Vergrößerung 20 000 x 3,5;
das Präparat wurde ebenso behandelt wie das Material
in Abbildung 11 a.

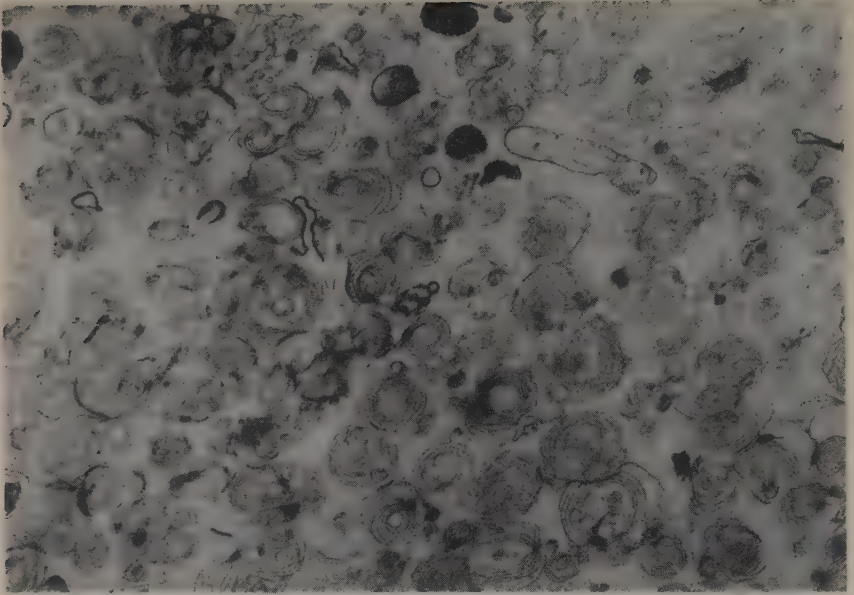


Abb.11 e

50%-Saccharosebände aus P_{20} ; Vergrößerung 10 000 x 3,5;
das Präparat wurde ebenso behandelt wie das Material
in Abbildung 11 a.

3.22 Zucker- und Aminosäureanalysen

Die Hexosen D-Mannose, L-Fucose, D-Glucose und N-Acetyl-D-Glucosamin kommen gehäuft in den Dictyostelen vor. Sie stellen Bestandteile von Zellmembranen dar, und ihre mengenmäßige Zusammensetzung variiert innerhalb der Dd-Entwicklung (9,10). Es war jetzt die Frage, ob diese Zucker Bestandteile der 100 000 x g-Fraktion sind. Dazu wurde P_{100} partialhydrolysiert und nach Neutralisation elektrophoresiert. Die Neutralbande aus der Elektrophorese wurde eluiert und chromatographisch im Lösungsmittel A getrennt. Dabei fanden sich zwei schnell laufende stark reduzierende und ninhydrinpositive Banden. Darunter lagen zwei weitere Banden, die sehr schwach reduzierend waren, dafür aber stark ninhydrinpositiv. Nach Totalhydrolyse aller eluierten Banden wurden die Zucker der beiden schnell laufenden Fraktionen papierchromatographisch, die Zucker der beiden langsam laufenden Banden gaschromatographisch analysiert.

Reihenfolge der Banden nach Partialhydrolyse:

	z_1	z_2	z_3	z_4
R_{Gluc}	0,50	0,65	1,05	1,30

Tab. 5Zuckerzusammensetzung nach Totalhydrolyse:

z_1	z_2	z_3	z_4
L-Fucose	L-Fucose	D-Glucose	D-Mannose
D-Ribose	D-Ribose		L-Fucose
L-Arabinose(?)	L-Arabinose(?)		N-Acetyl-
D-Xylose	D-Xylose		D-Glucosamin

Tab. 6

z_3 und z_4 enthalten die Zucker D-Mannose, L-Fucose, N-Acetyl-D-Glucosamin und D-Glucose. Die in großer Menge auftretende D-Glucose in z_3 dürfte wohl aus dem von White und Sussman (16) gefundenen alpha-Polyglucan stammen. z_1 und z_2 enthielten die Zucker L-Fucose, D-Ribose, L-Arabinose(?) und D-Xylose. Da P_{100} noch die gesamten Ribosomen enthält, wird die Ribose zum größten Teil aus der RNS stammen. Erstaunlich war das Auftreten von Arabinose und Xylose, so daß es erst für ein Artefakt gehalten wurde. Aber bereits White und Sussman fanden 1962 (17) eine TCE- und Alkali-unlösliche Fraktion in den Dd-Zellen, die zum größten Teil aus Glucose und einer Spur von Arabinose bestand. Die Bedeutung dieser Zucker und ihre Herkunft, ob sie im Cytoplasma oder in der Zellmembran gehäuft vorkommen und ob sie für verschiedene Entwicklungsstadien der Dd-Zellen charakteristisch sind, wurde nicht untersucht. Ein Gaschromatogramm, auf dem diese Zucker zu sehen sind, zeigen die Abbildungen 12a und 12b.

Chromatographiert wurde mit einem Hewlett-Packard-Gaschromatograph Modell 402 an einer Säule, die mit EONSS-M auf Chromosorb Q gefüllt war, mit Stickstoff als Trägergas. Es wurde mit Temperaturprogramm $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von 160°C - 167°C gearbeitet.

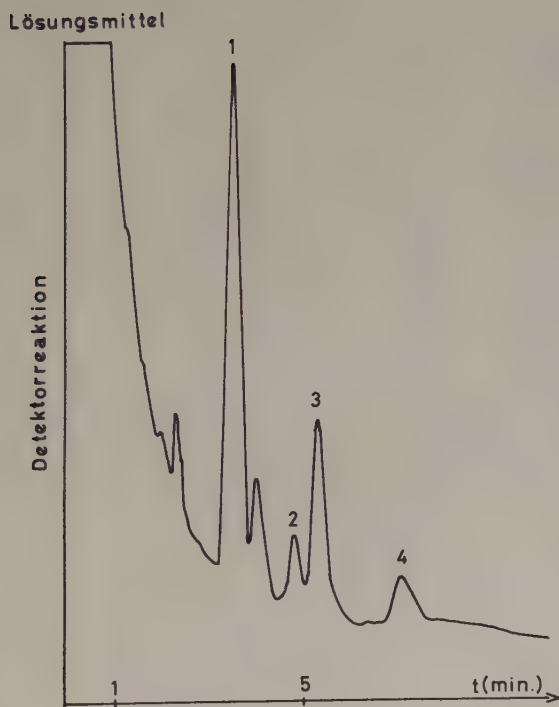


Abb. 12 a

Gaschromatogramm der Fraktion z_2 ohne Standard

1 = L-Fucose; 2 = D-Ribose; 3 = L-Arabinose; 4 = D-Xylose

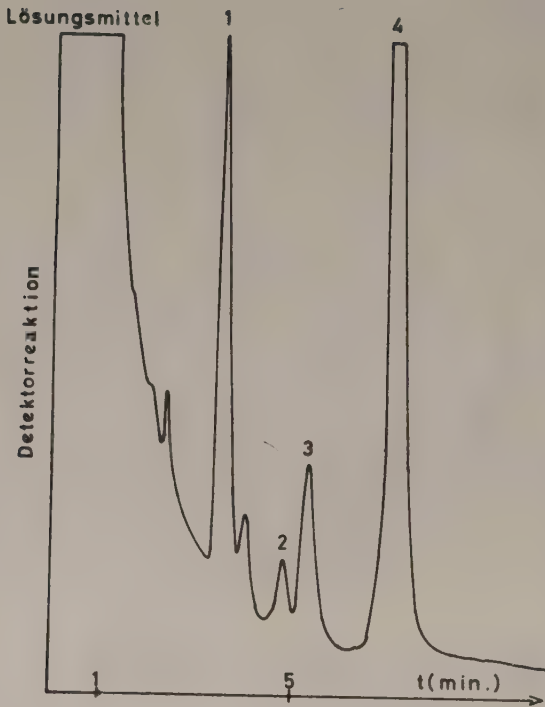


Abb. 12 b

Gaschromatogramm der Fraktion z_2 mit D-Xylose als Standard

1 = L-Fucose; 2 = D-Ribose; 3 = L-Arabinose; 4 = D-Xylose

Ob GDP-Mannose am KE-Stoffwechsel von P_{100} teilnimmt und somit in andere Zucker umgewandelt werden kann, sollte nun untersucht werden. Denn GDP-D-Mannose kann zum Beispiel über GDP-4-keto-6-desoxy-D-Mannose in GDP-L-Fucose umgesetzt werden. Es mußte also entschieden werden, ob die Einbaukinetik nur den Einbau von GDP-Mannose repräsentiert oder ob noch ein anderer Zucker, der aus GDP-Mannose gebildet werden kann, nach Inkubation mit GDP-Mannose- C^{14} in den Partikeln erscheint. Die Totalhydrolyse der Partikel nach Mannose- C^{14} -Einbau ist in Abbildung 13 dargestellt. Dazu wurde ein 20-Stunden-Inkubationsansatz totalhydrolysiert, und die Zucker wurden nach Entfernen der Aminosäuren im Lösungsmittel C getrennt. Dabei fand sich nur ein radioaktiver Peak auf dem Chromatogramm, der mit Mannose identisch war.

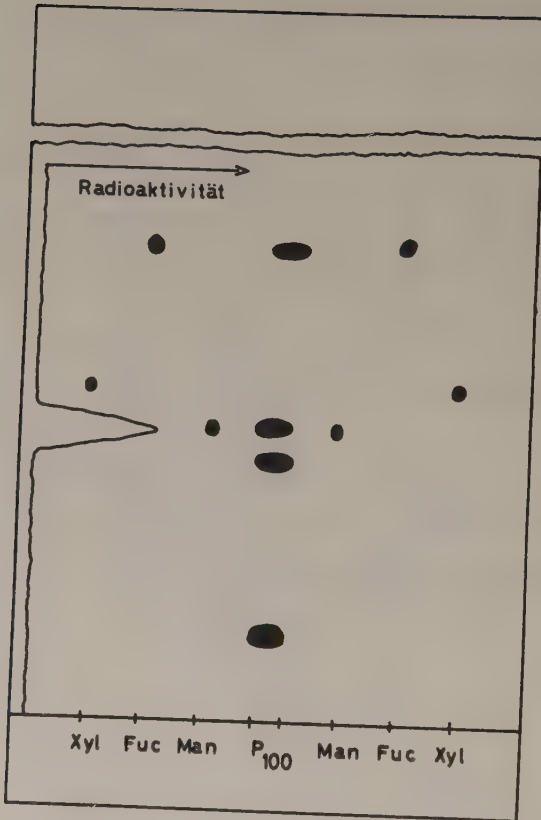


Abb. 13

Totalhydrolyse von P₁₀₀ nach Mannose-C¹⁴-Einbau.

3.23 Kohlenhydrat-Eiweiß-Bindung

Alle Einbaukurven beziehen sich auf den mit TCE fällbaren Proteinanteil. In dieser TCE-Fällung ist die Mannose Bestandteil des KH-Anteils eines Glykoproteids. Behandelt man eine solche TCE-Fällung etwa 2 Tage lang mit 1 N KOH bei 4°C, so kann man zwei Fraktionen gewinnen. Wird nämlich die Lösung bis pH 7 neutralisiert, so präzipitiert sehr wenig Protein am Neutralpunkt, und fast die gesamte Radioaktivität befindet sich noch im Überstand. Unterhalb des Neutralpunktes dagegen fällt das gesamte Protein aus. Etwa 60% der Radioaktivität sind jetzt im Sediment vorhanden, während die übrigen 40% im wasserklaren Überstand zu finden sind. Dieses Ergebnis schien darauf hinzuweisen, daß Mannose in zwei KH-Teile eingebaut wird, die über verschiedene Bindungen an das Trägerprotein geknüpft sind. Um etwas über die Aminosäurezusammensetzung in P₁₀₀ zu erfahren, wurden die Partialhydrolysen z₁, z₂, z₃, z₄ nach Totalhydrolyse mit 6 N HCl in einem zweidimensionalen Papierchromatogramm auf Aminosäuren analysiert. Chromatographiert wurde mit den Laufmitteln E und F.

Aminosäurezusammensetzung von:

z ₁	z ₂	z ₃	z ₄
Serin	Serin	Serin	Serin
Alanin	Alanin	Alanin	
Threonin	Threonin		
Asparagin	Asparagin		

Tab. 7

Es zeigte sich bei der Analyse ein deutliches Überwiegen der Hydroxyaminosäuren. Da die Bindung des KH-Anteils über Serin in Alkali gespalten wird und Hydroxyaminosäuren in den Partialhydrolysen von P_{100} gefunden werden, scheint möglicherweise ein KH-Teil über Serin oder Threonin gebunden zu sein. Bei der Spaltung der O-glykosidischen Bindung in Alkali wird Serin unter β -Elimination in Dehydroalanin umgewandelt (18,19). Die dabei auftretende Doppelbindung hat ein Absorptionsmaximum bei 241 m μ . Löst man P_{100} in 0,1 N KOH und verfolgt die Extinktion dieses Ansatzes photometrisch bei 241 m μ gegen die Zeit, so erhält man einen stetigen Anstieg der Extinktion. Auch dieser Befund würde für eine O-glykosidische Bindung über eine Hydroxyaminosäure sprechen.

3.3 Mechanismus des Mannose-Transfers

3.31 Untersuchungen über die biphasische Einbaukinetik

Beim Einbau von Mannose in P_{100} fiel der ständig vorhandene biphasische Verlauf der Einbaukurven auf. Besonders kam das zum Ausdruck nach Trennung der Partikel über einen Saccharosegradienten. Eine typische Kurve zeigt Abbildung 14.

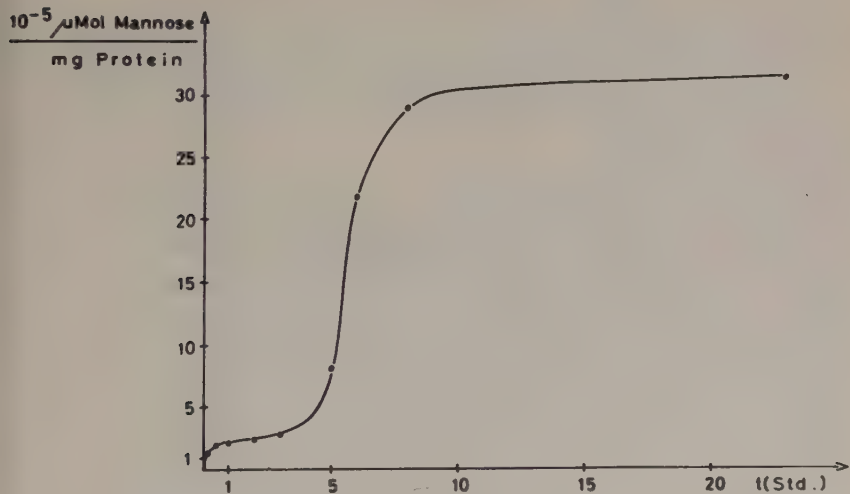


Abb. 14

Einbaukinetik der 45%-Saccharose-Fraktion von P_{100}

Der Ansatz enthielt:

3,06 mg Protein; 48,7 μ Mol Tris/HCl pH 7,5;

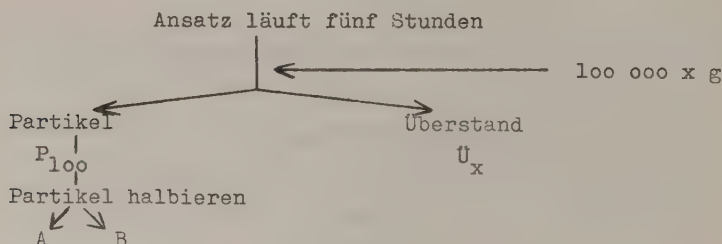
3,5 μ Mol Mg^{2+} ; 6,78 $\cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14}

Das Gesamtvolumen betrug 860 μ l.

Innerhalb der ersten zwei Stunden steigt die Einbaurate schnell an, um sich dann für die nächsten Stunden nur mäßig zu erhöhen. Nach vier bis fünf Stunden, gerechnet vom Beginn der Inkubation, setzt plötzlich ein rasanter Einbau für die nächsten fünf Stunden ein. Der erste Gedanke war, daß die Einbaukurve den Einbau von zwei verschiedenen Zuckern zeigt. Der erste Einbau sei Mannose aus GDP-Mannose, der zweite dagegen Fucose aus GDP-Fucose. Wie aber bereits oben dargelegt wurde, wird Mannose durch P_{100} in kein anderes Stoffwechselprodukt umgewandelt. Damit ließ sich die doppelläufige Einbaukurve nicht erklären.

Unterbrecherversuch

Ob der sehr schnelle Einbau über ein neugebildetes Substrat geht, sollte folgender Versuch entscheiden. Ein üblicher Standardeinbauversuch wurde angesetzt. Nach fünf Stunden wurde der Versuch unterbrochen. Nach Abzentrifugieren der Partikel wurde der Überstand abgenommen, und die Partikel wurden nach einmaligem Waschen halbiert. Die eine Hälfte wurde mit dem vorher abgenommenen Überstand versetzt, die andere Hälfte mit frischer GDP-Mannose. Das Schema zeigt noch einmal den Gang des Versuches.



Neuer Ansatz: A) 1/2 Partikel plus $\ddot{U}_x$

b) 1/2 Partikel plus frische GDP-Mannose- C^{14}

Wenn der zweite Anstieg der Einbaukinetik nicht über GDP-Mannose geht, muß Ansatz B erst nach einer Latenzzeit, in der die unbekannte Substanz X entsteht, einen merkbaren Einbau zeigen, während Ansatz A sofort einen schnellen Anstieg aufweisen muß.

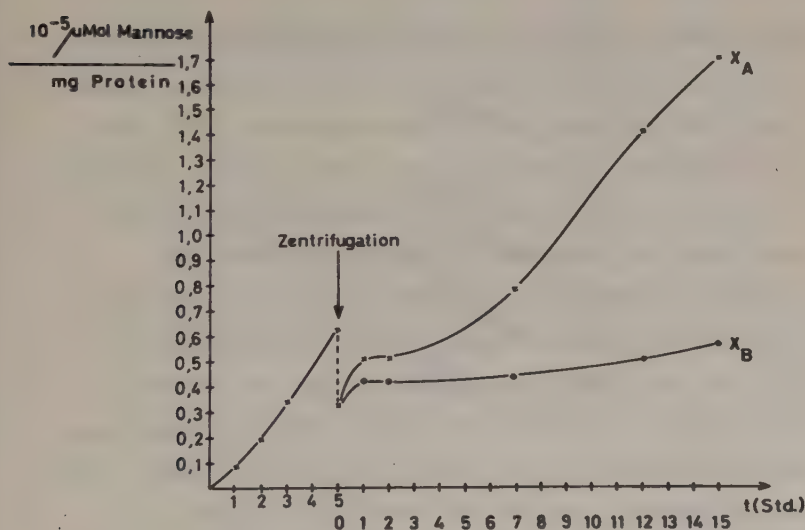


Abb. 15

Unterbrecherversuch

Der Ansatz enthielt: 8,67 mg Protein; 88,3 μ Mol Tris/HCl pH 7,5; 50 μ Mol Mg^{2+} ; $6,24 \cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14} ; Gesamtvolumen 1150 μ l. Nach dem Abzentrifugieren:

A) 3,3 mg Protein; 383 μ l $\ddot{U}_x$; B) 3,3 mg Protein; 38,2 μ Mol Tris/HCl pH 7,5; 25 μ Mol Mg^{2+} ; $2,74 \cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14} ; Gesamtvolumen 430 μ l.

Der Ansatz A läuft tatsächlich beträchtlich schneller an als der Einbau von Ansatz B. Mannose wird also nicht nur in der Form des Nukleotidzuckers, sondern auch von einer Vorstufe eingebaut, die von S innerhalb der ersten fünf Stunden hergestellt wird und nicht identisch ist mit GDP-Mannose. Daß es sich dabei auf keinen Fall um einen Nukleotidzucker handelt, konnte an einem weiteren Versuch gezeigt werden.

Untersuchung mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese

GDP-Mannose läuft auf Grund seiner beiden Phosphatgruppen in der Elektrophorese bei pH 5,3 in Richtung Anode. Wenn ein anderes Produkt innerhalb der ersten Stunden entsteht, so wird sich dieses vermutlich in seinem elektrophoretischen Verhalten gegenüber GDP-Mannose unterscheiden. Es wurde GDP-Mannose- C^{14} in S eingebaut. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen. Diese Proben wurden aber nicht wie üblich mit TCE gefällt, sondern eine Minute bei $100^{\circ}C$ erhitzt. Bei dieser Behandlung fällt das Eiweiß aus, aber noch vorhandene GDP-Mannose wird nicht zerstört. Nach Abzentrifugieren des Eiweißes wurde der Überstand bei pH 5,3 elektrophoresiert. Als Vergleichssubstanz lief GDP-Mannose mit. Dabei zeigte sich, daß zum Zeitpunkt Null nur GDP-Mannose vorhanden war. Aber bereits innerhalb der ersten halben Stunde taucht eine neue Substanz (in der Arbeit mit X-Mannose bezeichnet) auf, die am Startpunkt liegenbleibt. Gleichzeitig wird der GDP-Mannosepeak kleiner.

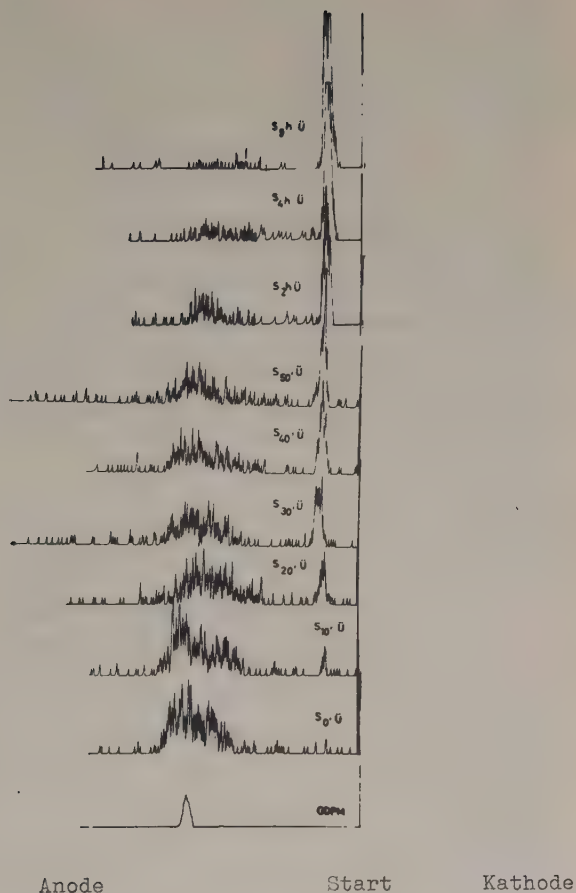


Abb. 16

Untersuchungen über das Zwischenprodukt mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese

Der Ansatz enthielt:

8,27 mg Protein; 78,1 μMol Tris/HCl pH 7,5; 60 μMol Mg^{2+} ; $6,5 \cdot 10^{-3}$ μMol GDP-Mannose- C^{14} . Das Gesamtvolumen betrug 1780 μl .

Die Elektropherogramme wurden mit einem Dünnschicht-Scanner ausgewertet.

Daß es sich bei dem Startpeak nur um Mannose handelt, die bei der Inkubation durch Zerstörung von GDP-Mannose entstehen könnte, konnte ausgeschlossen werden. Eluiert man nämlich den Startpeak und chromatographiert ihn im Laufmittel B, so bleibt die unbekannte Substanz am Startpunkt liegen, im Laufmittel für Oligosaccharide (A) dagegen läuft sie wenige Zentimeter. Das Protein, das beim Erhitzen der Proben ausfiel, wurde wie üblich gewaschen und auf seine Radioaktivität geprüft. Eine quantitative Übersicht über das Verhalten von unbekannter Substanz, GDP-Mannose und Mannoseeinbau in die Partikel während der Inkubation gibt Abbildung 17.

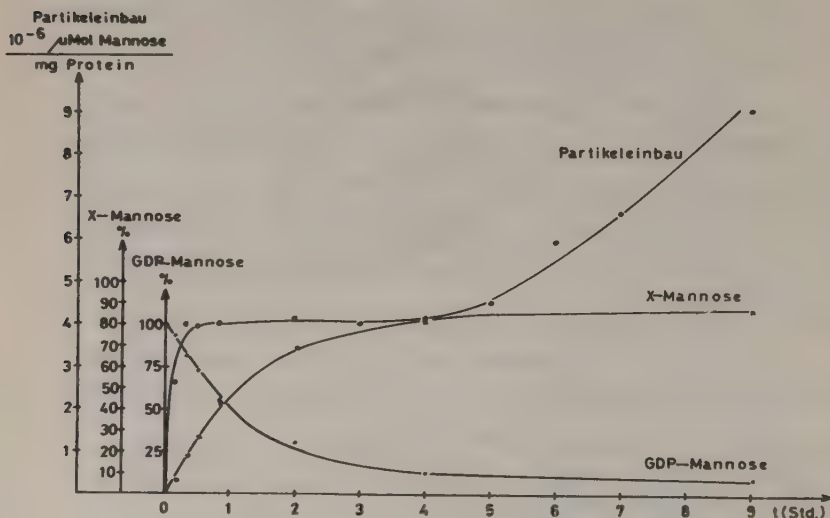


Abb. 17

Abhängigkeit der zweiten Einbauphase von synthetisierter X-Mannose

Die mengenmäßige Zusammensetzung des Ansatzes entsprach dem Ansatz in Abbildung 16.

Die Kurven zeigen folgendes: Im Laufe der ersten Stunden entsteht eine unbekannte Vorstufe. Wenn diese in hinreichender Menge vorliegt, so erfolgt der steile Anstieg der Einbaukinetik. Diese Substanz ist die Voraussetzung für den hohen Einbau von Mannose in die Partikel. Damit ist der zweite Teil der Kurve erklärt und der Einbau von einem anderen Zucker, der aus Mannose entstehen könnte, ausgeschlossen. Der erste Anstieg der Kurve ist der direkte Einbau von Mannose aus GDP-Mannose, der zweite stellt den Einbau von Mannose aus X-Mannose dar. Solange GDP-Mannose in hinreichender Menge vorliegt, wird X-Mannose hergestellt und der Einbau von Mannose aus GDP-Mannose gehemmt. Diese Hemmung des Mannoseeinbaus ließ sich durch Zugabe von GDP-Mannose zu einem Inkubationsansatz, der bereits sieben Stunden mit GDP-Mannose inkubierte, zeigen. Der Kontrollansatz baut nach zwölf Stunden wie üblich rasant ein, während der andere Ansatz durch die erneute Zugabe von GDP-Mannose gehemmt wird. Erst nachdem die zugesetzte GDP-Mannose in X-Mannose umgewandelt ist, erscheint der steile Anstieg.

Das Versuchsergebnis ist in Abbildung 18 dargestellt.

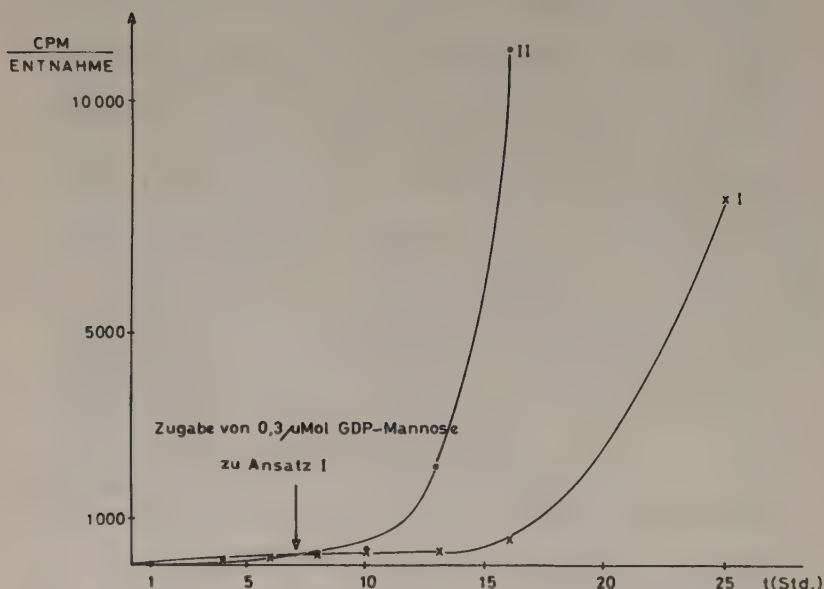


Abb. 18

Hemmung der zweiten Einbauphase durch GDP-Mannose

Ansatz II enthielt: 0,6 mg Protein; 47,9 μMol Tris/HCl pH 7,5; 3,5 μMol Mg^{2+} ; 3,51 $\cdot 10^{-3}$ μMol GDP-Mannose- C^{14} ; 9,1 $\cdot 10^{-3}$ μMol nichtmarkierte GDP-Mannose; das Gesamtvolumen betrug 570 μl .

Ansatz I entsprach in der Zusammensetzung genau dem Ansatz II, nur wurden hier nach 7 Stunden 0,3 μMol nichtmarkierte GDP-Mannose dazugegeben.

GDP-Mannose wird in den ersten Stunden in X-Mannose umgewandelt. Dieses X muß im Laufe der Inkubation aus den Partikeln freiwerden, da X-Mannose nach Abzentrifugieren der Partikel im Überstand zu finden ist und der Versuchsansatz mit gewaschenen Partikeln angesetzt wird.

Einbaukinetik nach Vorinkubation mit nichtmarkierter GDP-Mannose

Ob das gebildete Zwischenprodukt einen Einfluß auf die erste Phase der Einbaukinetik hat, wurde durch folgenden Versuch untersucht. Ein Inkubationsansatz wurde fünf Stunden mit nichtmarkierter GDP-Mannose vorinkubiert. Danach wurde erst GDP-Mannose- C^{14} zugegeben und der Einbau verfolgt.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 19 dargestellt.

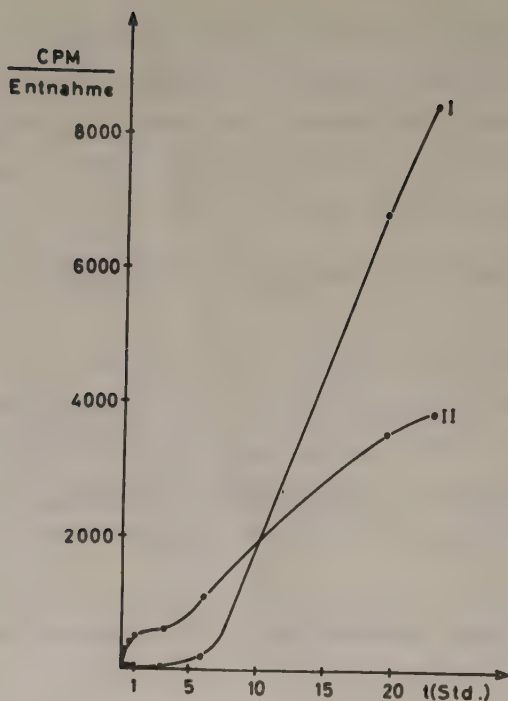


Abb. 19

Einbaukinetik nach Vorinkubation mit nichtmarkierter GDP-Mannose

Ansatz I enthielt: 1,38 mg Protein; 33,1 μ Mol Tris/HCl pH 7,5; 2 μ Mol Mg^{2+} ; $8,5 \cdot 10^{-3}$ μ Mol nichtmarkierte GDP-Mannose; Gesamtvolumen 420 μ l. Nachdem dieser Ansatz 5 Stunden bei 37°C vorinkubiert worden war, wurden $3,11 \cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14} hinzugegeben und der Einbau von Mannose über die Zeit verfolgt.

Kontrollansatz II enthielt: 1,38 mg Protein; 33,1 μ Mol Tris/HCl pH 7,5; 2 μ Mol Mg^{2+} ; $3,11 \cdot 10^{-3}$ μ Mol GDP-Mannose- C^{14} ; Gesamtvolumen 430 μ l.

Nimmt man an, daß in dieser Vorinkubationszeit X aus den Partikeln frei wird und gleichzeitig die Umwandlung von GDP-Mannose in X-Mannose erfolgt, so läßt sich das Verschwinden der ersten Einbauphase nur mit dem Vorhandensein eines Hemmfaktors erklären. Dafür kommen in Frage: X, X-Mannose oder eine andere unbekannte Substanz.

Einbaukinetik nach Vorinkubation ohne GDP-Mannose

Da während der Inkubation eine beträchtliche Menge ninhydrinpositiver und reduzierender Substanzen freigesetzt wird, sollte ein Versuch zeigen, ob diese Produkte einen Einfluß auf den Verlauf der Einbaukinetik haben. Dazu wurde ein üblicher Inkubationsansatz ohne GDP-Mannose in der Wärme vorinkubiert, und erst nach fünf Stunden wurde GDP-Mannose- C^{14} zugegeben.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 2c dargestellt.

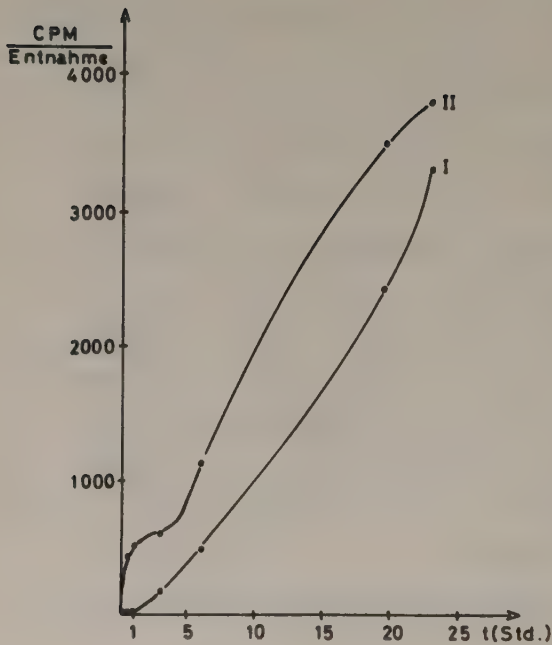


Abb. 2o

Einbaukinetik nach Vorinkubation ohne GDP-Mannose

Ansatz I enthielt: 1,38 mg Protein; $33,1 \mu\text{Mol}$ Tris/HCl pH 7,5; $2 \mu\text{Mol}$ Mg^{2+} ; Gesamtvolumen $40 \mu\text{l}$. Nach fünf-stündiger Vorinkubation wurden $3,11 \cdot 10^{-3} \mu\text{Mol}$ GDP-Mannose- C^{14} zugegeben und der Mannoseeinbau über die Zeit verfolgt. Die Zeit 0 im Diagramm ist der Zeitpunkt, in dem GDP-Mannose- C^{14} zugegeben wurde.

Kontrollansatz II hatte dieselbe Zusammensetzung wie der Kontrollansatz aus Abbildung 19.

Auch hierbei verschwindet die erste Einbauphase. Da kein X-Mannose vorliegt, kann diese Substanz keinen Einfluß auf den Mannoseeinbau aus GDP-Mannose haben. Somit scheint ein Faktor unter den freigesetzten ninhydrinpositiven und reduzierenden Substanzen zu existieren, der den direkten Mannosetransfer aus der Nukleotidvorstufe hemmt.

3.32 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der zweiten Einbauphase

Der zweite Teil der Einbauphase besteht aus einem rapiden Mannoseeinbau. Wie dargelegt wurde, wird hier die Mannose von einer anderen Vorstufe als GDP-Mannose auf den Acceptor übertragen. Um diese Mannosetransferase zu charakterisieren und ihre Affinität zu X-Mannose zu bestimmen, wurde die Michaelis-Menten-Konstante ermittelt unter der Annahme, daß nach etwa 8 Stunden die gesamte GDP-Mannose quantitativ in das Intermediat umgesetzt wurde.

Es wurden Einbaukurven mit verschiedenen GDP-Mannosekonzentrationen aufgenommen.

Die gewonnenen Kurven sind in den Abbildungen 21 a - e dargestellt.

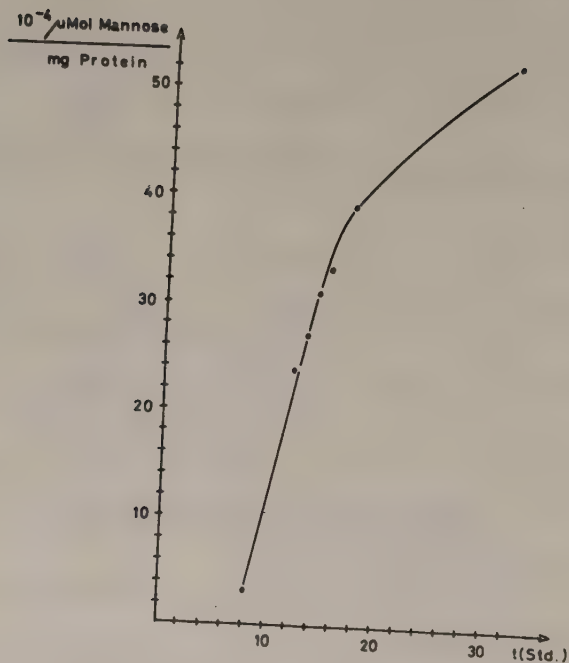


Abb. 21 a

Einbaukinetik für die K_m -Bestimmung

Der Ansatz enthielt: 0,6 mg Protein; 48,7 $\mu\text{Mol Tris/HCl}$ pH 7,5; 3,5 $\mu\text{Mol Mg}^{2+}$; $3,52 \cdot 10^{-3} \mu\text{Mol GDP-Mannose-C}^{14}$; $9,1 \cdot 10^{-3} \mu\text{Mol nichtmarkierte GDP-Mannose}$; das Gesamtvolumen betrug 585 μl .

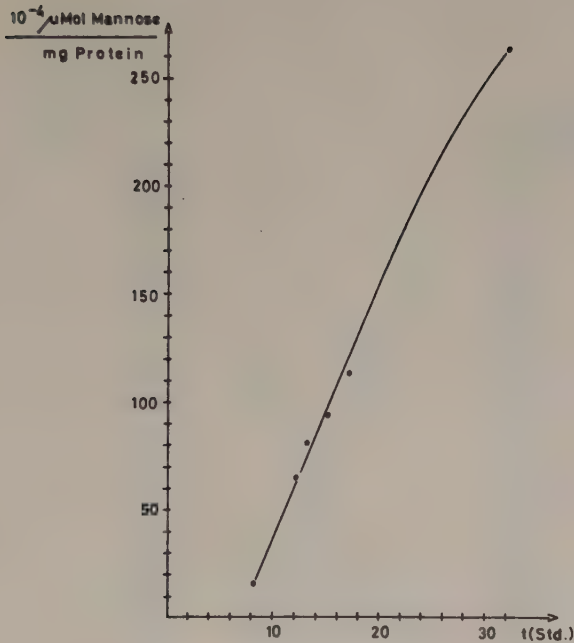


Abb. 21 b

Einbaukinetik für die K_m -Bestimmung

Die Menge der nichtmarkierten GDE-Mannose wurde auf $4,7 \cdot 10^{-2} \mu\text{Mol}$ erhöht; die übrige Zusammensetzung entsprach dem Ansatz aus Abbildung 21 a; das Gesamtvolumen betrug 590 μl .

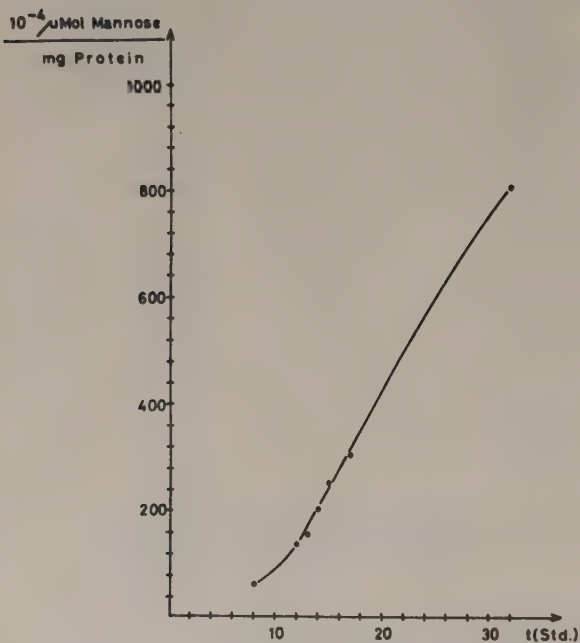


Abb. 21 c

Einbaukinetik für die K_m -Bestimmung

Die Menge der nichtmarkierten GDP-Mannose wurde auf $9,43 \cdot 10^{-2} \mu\text{Mol}$ erhöht; die übrige Zusammensetzung entsprach dem Ansatz aus Abbildung 21 a; das Gesamtvolumen betrug 595 μl .

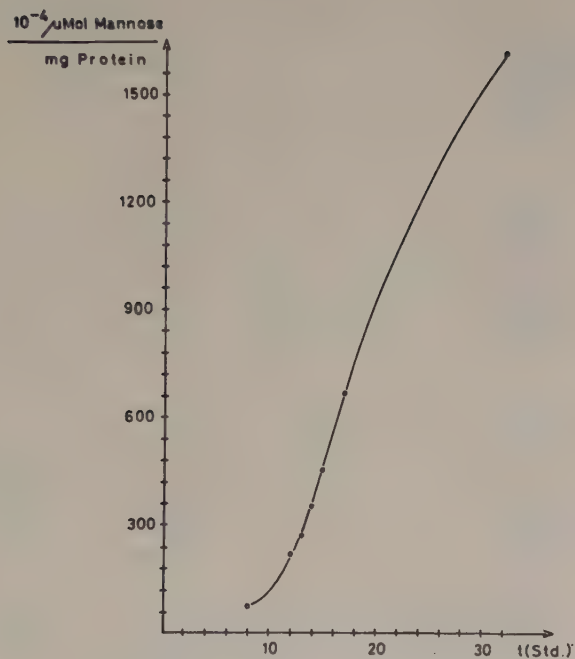


Abb. 21 d

Einbaukinetik für die K_m -Bestimmung

Die Menge der nichtmarkierten GDP-Mannose wurde auf $0,341 \mu\text{Mol}$ erhöht; die übrige Zusammensetzung entsprach dem Ansatz aus Abbildung 21 a; das Gesamtvolumen betrug $620 \mu\text{l}$.

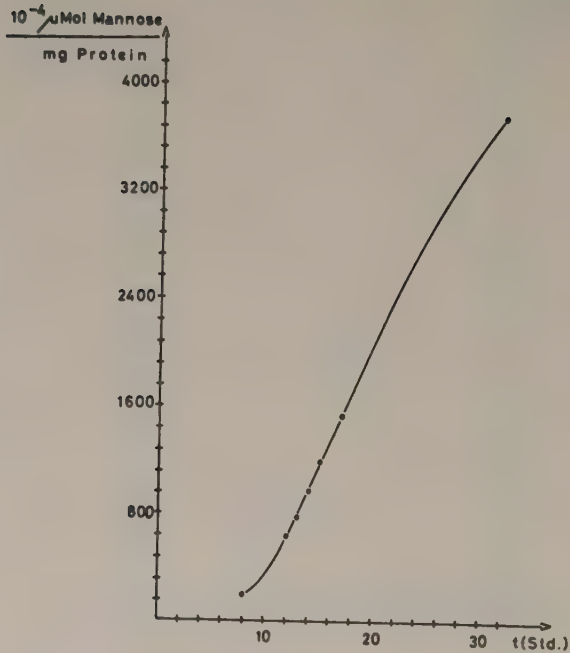


Abb. 21 e

Einbaukinetik für die K_m -Bestimmung

Die Menge der nichtmarkierten GDP-Mannose wurde auf $1,51 \mu\text{Mol}$ erhöht; die übrige Zusammensetzung entsprach dem Ansatz aus Abbildung 21 a; das Gesamtvolumen betrug $740 \mu\text{l}$.

In dem Bereich, in dem der Einbau linear verläuft, wurde die jeweilige Geschwindigkeit dM/dt für jede Kurve aus der graphischen Darstellung entnommen. Wenn der Einbau von X-Mannose der Michaelis-Menten-Kinetik folgt, so gilt

$$v = \frac{V_{\max} \cdot (S)}{K_m + (S)}$$

Bei reziproker Darstellung der Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der reziproken Substratkonzentration müssen die gemessenen Werte im Lineweaver-Burk-Diagramm auf einer Geraden liegen.

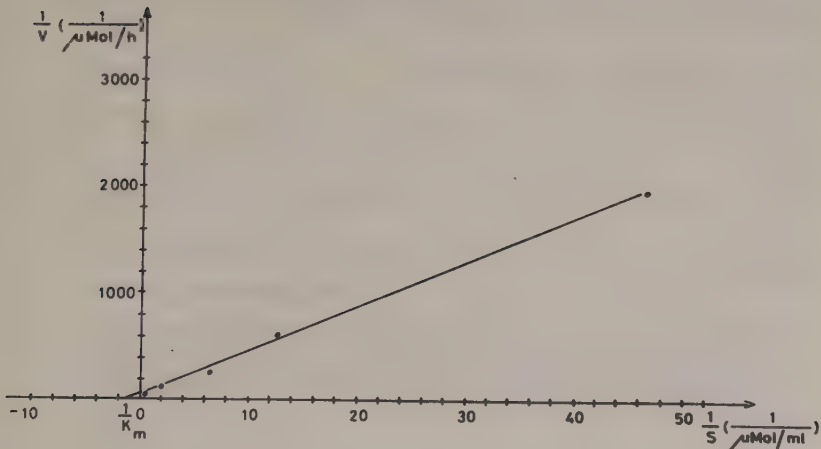


Abb. 22

K_m -Bestimmung im Lineweaver-Burk-Diagramm

$K_m = 6,7 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}$; $V_{\max} = 17 \cdot 10^{-3} \mu\text{Mol/Std.}$

Wie die Abbildung zeigt, verläuft die Umsetzung X-Mannose + Acceptor = M-X-Acceptor oder M-Acceptor + X streng nach der Michaelis-Menten-Kinetik. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergibt einen K_m -Wert von $6,7 \cdot 10^{-4}$ Mol/l. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate liefert die maximale Geschwindigkeit des Enzyms. Der abgelesene Wert beträgt $V_{\max} = 17 \cdot 10^{-3}$ μ Mol/Std. Der K_m -Wert $6,7 \cdot 10^{-4}$ Mol/l ist ein sehr niedriger Wert. Die Transferase, die das aus GDP-Mannose gebildete Zwischenprodukt auf den Acceptor überträgt, besitzt somit eine hohe Affinität zu X-Mannose.

3.33 Versuche zur Isolierung des Zwischenprodukts

Um X-Mannose in größerer Menge zu gewinnen, wurden jeweils 1 mg Protein von S, teilweise auch von P_{100} direkt, mit 1 mg nichtmarkierter GDP-Mannose, der etwas GDP-Mannose- C^{14} als Marker zugesetzt war, über 20 Stunden bei 37°C inkubiert, außerdem enthielt jeder Ansatz wie üblich ca. $60 \mu\text{Mol}$ Tris/HCl pH 7,5 und $30 \mu\text{Mol}$ Mg^{2+} . Nach der Inkubation wurden die Partikel bei $100\,000 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand gesammelt. Nach mehreren derartigen Ansätzen wurden die gesammelten Überstände über eine DEAE-Sephadex-A-25-Säule aufgetrennt. Ein typisches Elutionsdiagramm zeigt Abbildung 23.

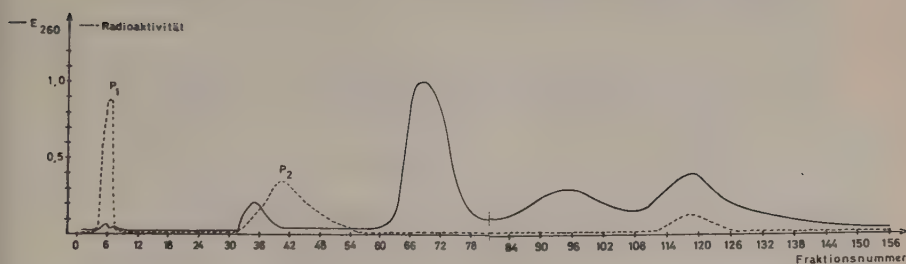


Abb. 23

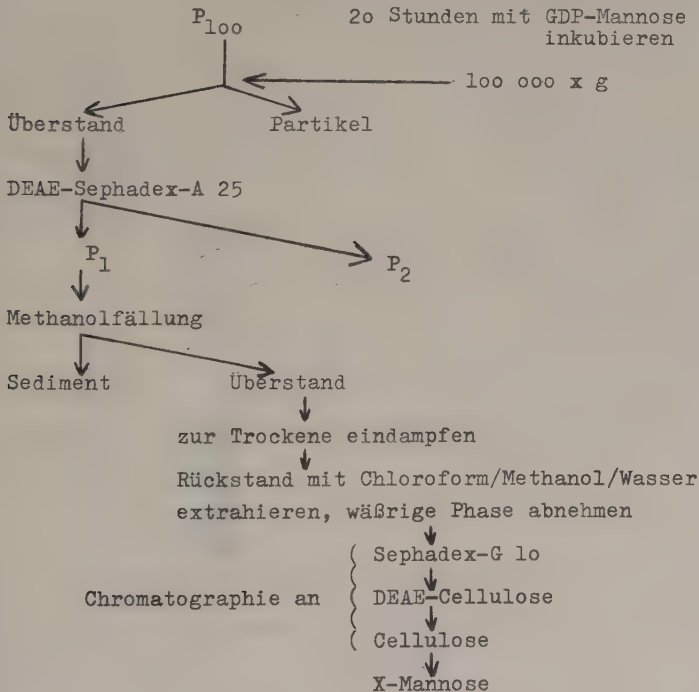
Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex-A 25 zur Isolierung von X-Mannose aus den Überständen von P₁₀₀-Inkubationsansätzen.

Zuerst wird ein scharfer radioaktiver Peak von der Säule eluiert, der eine geringe Absorption bei 260 m μ hat. Der zweite Peak ist ebenfalls radioaktiv und absorbiert im UV. Dabei folgt die Radioaktivitätskurve aber nicht streng der Absorptionskurve. Der dritte Peak hatte das typische Spektrum von Guanin und lief nicht in der Elektrophorese bei pH 5,3. Der vierte im UV absorbierende Peak ist nicht radioaktiv. Zuletzt verläßt nichtumgesetzte GDP-Mannose die Säule.

Bisher wurde vorwiegend P_1 untersucht. Ob die Radioaktivität des eluierten Peaks P_1 nur durch Mannose-C¹⁴ verursacht wurde, entschied eine Totalhydrolyse von P_1 . Es zeigte sich auch hier, daß Mannose nicht verstoffwechselt wird und die Radioaktivität nur von der Mannose herrührt.

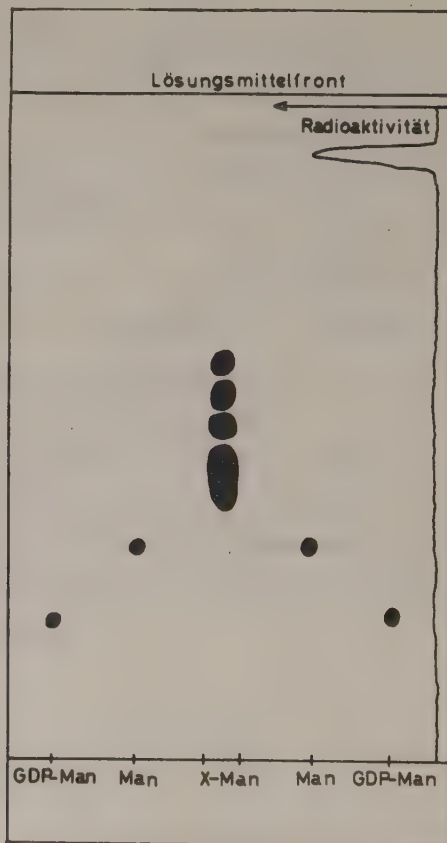
Um analytische Aussagen über die Zusammensetzung von P_1 machen zu können, mußte P_1 weiter gereinigt werden. Der gefriergetrocknete Rückstand von P_1 wurde mit Methanol bis zu einer Endkonzentration von 70% versetzt. Dabei fiel feinflockiges Material aus. Nach Abzentrifugieren befand sich die Radioaktivität in der Methanolphase. Der Rückstand wurde noch einmal mit absolutem Methanol extrahiert. Die vereinigten Methanolüberstände wurden nun zur Trockene einge-

dampft. Die zurückbleibende Trockenmasse wurde mit Chloroform/Methanol/Wasser 1/1/1 extrahiert. Dabei ging die Radioaktivität in die wäßrige Phase. Diese Schicht wurde abgenommen, eingengt und anschließend an Sephadex-G 10, DEAE-Cellulose und an reiner Cellulose chromatographiert. Das nachfolgende Schema zeigt noch einmal den Aufarbeitungsgang.



Einige Mikroliter der so gereinigten X-Mannose wurden nun im Lösungsmittel D über Nacht chromatographiert. Dabei lief die Radioaktivität fast mit der Lösungsmittelfront, war nicht ninhydrinpositiv und nicht reduzierend. Darunter lagen vier ninhydrinpositive Banden, von denen die unterste stark gelblich gefärbt war. Alle diese Banden laufen in diesem Lösungsmittel beträchtlich schneller als Aminosäuren und sind ebenfalls nicht reduzierend.

Abb. 24
Papierchromatogramm
von gereinigter
X-Mannose mit
Äthylacetat/Butanol/
Eisessig/Wasser
3/4/4/2,5 als
Laufmittel



Als nächstes wurde das Verhalten von gereinigter X-Mannose in der Elektrophorese bei pH 5,3 untersucht. Bei diesem pH-Wert laufen freie Aminosäuren kaum, während sich Peptide beträchtlich schnell zur Kathode bewegen. Nach 15 Minuten Laufzeit bei 70 Volt/cm werden vier ninhydrin-positive Banden gefunden, von denen sich drei weit vom Startpunkt in Richtung Kathode entfernt haben. Die vierte Bande liegt am Start. Nur diese Bande ist radioaktiv.



Abb. 25

a

b

a) Elektropherogramm von gereinigter X-Mannose in Pyridin/Eisessig/Wasser 10/4/986 pH 5,3; Laufzeit 20 Minuten bei 3000 Volt (50 Volt/cm).

b) Elektropherogramm von x_0 nach Hydrolyse in 0,1 N HCl 45 Minuten bei 100°C; Laufzeit 1 Std. in Ameisensäure/Eisessig/Wasser 50/150/800 pH 1,8 bei 3000 Volt (50 Volt/cm).

Nach Elution aller vier Banden wurden die zur Kathode gelaufenen Fraktionen mit 6 N HCl Endkonzentration über Nacht bei 100°C totalhydrolysiert. Wenn es sich bei den Banden tatsächlich um Peptide handelt - und es sprach sowohl die gute chromatographische und elektrophoretische Beweglichkeit dafür -, müssen nach der Totalhydrolyse freie Aminosäuren auftreten. Da nicht untersucht wurde, ob die erhaltenen Banden einheitliche Peptide darstellen oder ob es sich um ein Gemisch handelt, wurde auf eine genaue Aminosäurenanalyse verzichtet. Die vermuteten Aminosäuren wurden mit der Elektrophorese getrennt und als freie Aminosäuren identifiziert. Da viele Aminosäuren bei pH 1,8 ähnlich laufen, konnte keine genaue Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Peptide angegeben werden. X-Mannose erschien bei der Reinigung über die verschiedenen Säulen stets als einheitlicher Peak. Bei der Papierchromatographie und der Elektrophorese erscheinen jetzt einzelne Peptide und eine radioaktive Bande, die in der Elektrophorese am Start liegenbleibt und im Chromatogramm fast mit der Front transportiert wird. Bei der Säulenchromatographie hätten freie Peptide von X-Mannose abgetrennt werden müssen, zumal die letzte Säule Cellulose p.A. mit demselben Mittel eluiert wurde, mit dem auch die Papierchromatogramme laufen. X-Mannose verläßt aber als einheitlicher radioaktiver Peak zusammen mit allen Peptiden die Cellulose-Säule, während es sich im Papierchromatogramm in fünf Banden aufspaltet. Wäre die Bande, die im

Papierchromatogramm fast mit der Front transportiert wird, die tatsächliche X-Mannose und würden die Peptide nicht dazugehören, hätte die Cellulose-Säule eine Trennung bringen müssen. Der einzige Unterschied zwischen Säulen- und Papierchromatographie bestand darin, daß die Säule in der Kälte eluiert wurde, während die Papierchromatogramme in der Wärme liefen. Man kann deshalb annehmen, die Peptide sind Bestandteil von X-Mannose und müssen so labil gebunden sein, daß eine Abspaltung während der Elektrophorese oder der Papierchromatographie in der Wärme erfolgen kann.

Die in der Elektrophorese am Start liegegebliebene Bande wurde mit 0,1 N HCl Endkonzentration bei 100°C 45 Minuten erhitzt. Nach der Hydrolyse wurde die Bande der Elektrophorese unterworfen. Dabei tritt eine starke ninhydrinpositive Bande auf, die in der Elektrophorese identisch mit Serin wandert. Weiterhin liefert die 45-Minuten-Hydrolyse eine reduzierende Fraktion, die in der Elektrophorese am Start liegt und nach Chromatographie im Laufmittel C aus Glycerin, sehr viel Glucose und Mannose besteht.

Nach Totalhydrolyse von X-Mannose mit 6 N HCl bei 120°C über 24 Stunden findet man im Aminosäuren-Analysator folgende Aminosäuren:

Lysin +++, Serin +++, Glycin ++; weiterhin Asparaginsäure, Threonin, Glutaminsäure, Alanin, Isoleucin und Leucin.

4. D i s k u s s i o n

Eine Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Zellstadium konnten Osborn und Sussman (15) bereits 1964 demonstrieren. Sie zeigten, daß das Auftreten eines galaktosehaltigen Mukopolysaccharids im Stadium des migrierenden Pseudoplasmodiums gekoppelt ist mit der Synthese bzw. Aktivierung einer Galaktose-Transferase, die Galaktose aus UDP-Galaktose in das Polymere überträgt und mit der Umwandlung des Conus in einen gestielten Fruchtkörper ihre höchste Aktivität erreicht. Die Zucker Fucose, Mannose, Glukose und N-Acetylglukosamin sind Bestandteile Polysaccharid-haltiger Zellmembran-Antigene (2), die für die Aggregation notwendig sind. Da nur Perjodatbehandlung die Präzipitierbarkeit dieser Zellmembranantigene aufhebt (12), erschien es sinnvoll, die Synthese dieser Oberflächenpolysaccharide mit der Aktivierung der dazu notwendigen Enzyme in Zusammenhang zu bringen. Wie der Stadienverlauf der Mannosetransferase-Aktivität zeigt, tritt mit dem Beginn der Aggregation eine sprunghafte Zunahme der Enzymaktivität auf. Es kann deshalb gesagt werden, daß ein hoch aktives Enzym mit dem für sein Substrat notwendigen Acceptor in genügender Menge zum Zeitpunkt der beginnenden Aggregation entsteht und während der gesamten Aggregationsphase vorhanden ist, das Mannose in stärkerem Maße als kurz vor der Aggregation überträgt. Auf Grund des Kurvenverlaufs könnte der Verdacht bestehen, es handele sich bei der hohen Transferase-Aktivität während

der vegetativen Phase um eine Bakterien-Transferase. Denn mit der kontinuierlichen Abnahme der Salmonellen im Kulturmedium sinkt die Enzymaktivität bis zum Zeitpunkt der beginnenden Aggregation. Es wäre somit denkbar, daß sich zwei Kurven überlagerten. Der erste abfallende Schenkel der Kurve wäre Bakterienaktivität, der zweite ansteigende Teil dagegen die echte Amöbentransferase. Diese Überlegungen stellten sich aber als falsch heraus. Der axenische Stamm von *Dictyostelium discoideum*, der, nur in einem Phosphatpuffer ohne Bakterien gezüchtet, zur Aggregation gebracht werden kann, zeigt genau denselben Verlauf der Enzymaktivität. Somit sind beide Kurventeile als echte Amöbentransferase anzusehen. Ob es sich bei dem relativ hohen Einbau von Mannose während der vegetativen Phase um eine andere Mannosetransferase handelt als bei der Aggregation oder um einen anderen Acceptor, in den Mannose eingebaut wird, konnte bis jetzt nicht geklärt werden. Es liegt aber nahe, das Enzymsystem, das Mannose mit beginnender Aggregation verstärkt in ein Glykoprotein einbaut, in Beziehung zur Zellaggregation zu bringen.

Wenn man annimmt, daß es sich bei den KH-haltigen Oberflächensubstanzen um Glykoproteide handelt, so bestünde einmal die Möglichkeit, daß Protein und KH-Teil an den Ribosomen synthetisiert und dann an die Zellmembran transportiert würde. Zum anderen hat man Hinweise darauf, daß nur der Proteinteil an den Ribosomen synthetisiert, dagegen

der KH-Anteil erst an einer membranoiden Struktur schrittweise ansynthetisiert wird. Wie der RNase-Versuch ergab, ist der Mannosetransfer unabhängig von der Proteinsynthese. Das gleiche Ergebnis lieferte die Saccharose-Gradiententrennung. Die höchste Transferase-Aktivität wird in der Bande gefunden, die spektrophotometrisch und elektrooptisch frei ist von Ribosomen. Ebenso wies die Hitze-stabilität der Acceptorpartikel darauf hin, daß Ribosomen keinen Anteil an der Übertragung der Mannose auf ein Glykoproteid haben. Welche Strukturen sind nun für den Mannosetransfer verantwortlich? Die Subfraktionen G_1 , G_2 , G_3 und S zeigen im elektronenoptischen Bild drei verschiedene Strukturen. In den beiden leichten Fraktionen G_1 und G_2 (20-25%ige Saccharosebände) stellen sich runde Partikel und kurze Membranteile dar. Zum Teil sitzen die 120 Å großen Partikel auf den Membranen. Sowohl die Größe als auch ihr typisches UV-Spektrum wies die Partikel als Ribosomen aus. Bei den Membranen handelt es sich vermutlich um Bruchstücke eines rauhen endoplasmatischen Redikulums. Ganz andere Strukturen lassen die Abbildungen 11 c, d erkennen. In den Subfraktionen G_3 und S treten membranoide Gebilde auf, gleichzeitig damit steigt die Aktivität des Mannosetransfers stark an. Zwei verschiedene Typen kann man unterscheiden. Die einen stellen Vesikel dar, die von einer Doppellamelle abgegrenzt werden. Dieses typische Membranbild findet sich besonders in der Subfraktion G_3 . Eine sehr

sonderbare Struktur zeigt die Subfraktion S, die die höchste Transferaseaktivität besitzt. Hier sieht man myelinähnliche Figuren, die in Zwiebelschalenform angeordnet sind. Die Zwiebelschalen liegen in konzentrischen Ringen umeinander und bestehen aus membranoidem Material, das nur aus einer Lamelle besteht. Hohl beschrieb bereits 1965 ein lamelläres, konzentrisches Membransystem in Futtervakuolen von Dd-Zellen (34). Zu Beginn der vegetativen Periode ist dieses Lamellensystem ganz schwach ausgebildet. Nach Phagozytose der Bakterien durch die Amöben formt sich das Membransystem in den Futtervakuolen der Dd-Zellen. Hohl meint, die Verdauung der Bakterien verschaffe der Amöbe Material, um daraus die myelinähnlichen Membranen zu bilden, wobei die Vakuolenmembran als Starter wirke. Der Gedanke, es handle sich hierbei um die Formierung von Membranen am Ende der vegetativen Phase der Dd-Entwicklung, die für die einsetzende Aggregation notwendig seien, liegt nahe. Es ist aber nichts über die Bedeutung und Funktion dieses lamellären Systems, das sich in Verdauungsvakuolen entwickelt, bekannt. Vergleicht man das elektronenmikroskopische Bild der Fraktion S von P_{100} mit einer ebenfalls sehr aktiven Fraktion aus P_{20} , die als 50%-Saccharose-Gradientenfraktion gewonnen wurde, so fällt sofort die große Ähnlichkeit beider Membrantypen und ihrer Anordnung auf. In P_{20} sind die Membranen noch dichter gepackt als in P_{100} . Zum Teil sieht es so aus, als ob sich hier einzelne Lamellen zu Doppel-

membranen mit einem ca. 150-200 Å großen Zwischenraum zusammengelagert hätten. Morr  und Mollenhauer fanden ebenfalls konzentrische Lamellen. Sie entdeckten sie in isolierten Golgi-Apparaten (35), und Mercer diskutierte die Möglichkeit, daß der Golgi-Apparat sich aus diesen konzentrischen Lamellen entwickle (36). Die konzentrische Anordnung würde sich dann auflösen, und die Lamellen würden zu der bekannten Form des Golgi-Apparates zusammentreten. Dieser Theorie würden die Bilder aus den Subfraktionen von P_{20} und P_{100} entsprechen. In P_{100} liegen einzelne Membranlamellen vor. P_{20} dagegen stellt vorwiegend dichtgepackte Doppelmembranen dar. Wenn man annimmt, daß die Einzelmembranen in P_{100} Vorstufen der Doppelmembranen aus P_{20} darstellen, so kann man eine Hypothese über die Entwicklung der myelinartigen Strukturen aus den elektronenoptischen Bildern ableiten. Die Einzellamellen würden zuerst zusammentreten und konzentrische Ringe von Doppelmembranen bilden. An einer Stelle würden dann diese myelinartigen Ringe fusionieren. Man sieht tatsächlich in den elektronenmikroskopischen Bildern von P_{20} Lamellen, die alle einem osmiophilen Ursprung zu entstammen scheinen. An diesem Fusionspunkt würde die Ringnatur der Lamellen aufgelöst werden. Je zwei zu einer Doppelmembran zusammengetretene Lamellen würden dann an ihren Enden verschmelzen, so daß jetzt eine in sich geschlossene hufeisenförmige Doppelmembran entst nde. Die hypothetische Entwicklung der mye-

linartigen Strukturen zeigt Abbildung 26 noch einmal schematisch.

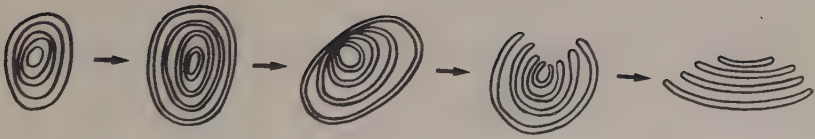


Abb. 26

Hypothese der Entwicklung von myelinartigen Strukturen
aus P_{20} und P_{100}

Der Golgi-Apparat umfaßt drei typische Komponenten: Membranen, die zu einem System von lamellär angeordneten Zisternen geformt sind, kleine Vesikel und große Vakuolen. Bei einem Schnitt durch eine ganze Zelle ist deshalb der Golgi-Apparat leicht zu identifizieren. Da die Subfraktion S aber mittels Ultraschallbehandlung und Saccharose-Gradientenzentrifugation gewonnen wurde, ist die Entscheidung, wozu das Lamellensystem zu zählen ist, schwierig. Zumal es sich möglicherweise nur um Vorstufen eines Golgi-Apparates oder um Vorstufen von Zellmembranen handelt. Auch weisen die Lamellen eine große Ähnlichkeit mit den Membranen des endoplasmatischen Retikulums auf. Dem Golgi-Apparat wird neben Speicher- und Sekretionsfähigkeit neuerdings die Aufgabe bei der Polysaccharidsynthese der Zellwandgrundsubstanz zugewiesen. Es wurde vermutet, daß der Golgi-Apparat mit der Bildung der Zellwand in einer direkten Verbindung steht, da die Golgi-Vesikel bei der Zellteilung immer in der Äquatorialebene zu finden sind, wo die neue Plasmamembran entsteht (37). Ein experimenteller Befund ist dabei interessant. Nach Entfernen der Zellwand traten in Protoplasten Syntheseprozesse ein, die auch eine Neubildung des Golgi-Apparates betraf. Dabei konnte ein direktes Übergehen von Teilen der Golgi-Membranen in die neu entstehende Zellwand beobachtet werden (37). Es könnte somit sein, daß der Golgi-Apparat direkt Membranteile für die Plasmamembran liefert oder daß die Komplettierung eines Proteins zu einem

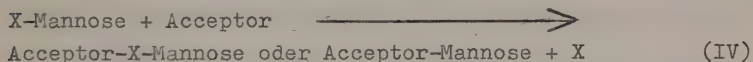
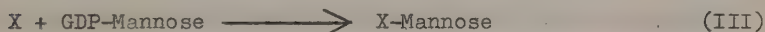
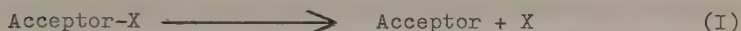
Oberflächenglykoproteid an einer membranoiden Struktur abläuft, die in einer Beziehung zum Golgi-Apparat steht.

Nach den Erkenntnissen der letzten Jahre über die Kohlenhydrat-Eiweiß-Bindung in Glykoproteiden (20, 21, 22, 23, 24, 25) besteht entweder eine N-glykosidische oder eine O-glykosidische Brücke vom Proteinteil zur Zuckerkomponente. Bei der N-glykosidischen Bindung ist häufig die delta-Aminogruppe des Asparagins mit dem C_1 des Zuckers verbunden. Ebenso kann die Zuckerkomponente glykosid-esterartig mit einer Säuregruppe, z.B. der von Asparaginsäure, verbunden sein. Die O-glykosidische Bindung geht von der $-CH_2OH$ -Gruppe des Serins oder der $-CHOH$ -Gruppe des Threonins aus. Diese Gruppe ist ebenfalls mit dem C_1 -Atom des Zuckers verknüpft. Die N-glykosidische Bindung ist alkalistabil, während die Bindung über eine Hydroxyaminosäure in Alkali unter β -Elimination und Umwandlung von Serin in Dehydroalanin gelöst wird. Eine weitere O-glykosidische Bindung ist über die epsilon-Hydroxylgruppe von Hydroxylysin möglich (26). Diese Bindung ist aber im Gegensatz zur O-glykosidischen Verknüpfung über Serin/Threonin alkalistabil. Da die Radioaktivität sich nach KOH-Behandlung und erneuter Fällung mit TCE auf Sediment und Überstand verteilt, kann Mannose nicht nur O-glykosidisch gebunden sein, sondern es muß darüber hinaus eine alkalistabile Bindung an den

Proteinteil existieren. Für die Bindung über eine Hydroxyaminosäure spricht weiterhin die Zunahme der Extinktion bei 241 m μ in Alkali, die durch das bei der β -Elimination entstehende Dehydroalanin auftritt. Ebenso ist für das Vorliegen einer O-glykosidischen Bindung das gehäufte Auftreten von Serin in den Partialhydrolysen anzuführen. Ob der ebenfalls in den Partialhydrolysen auftretende Zucker Xylose an der Bindung des Kohlenhydratteils an das Protein beteiligt ist, läßt sich noch nicht entscheiden. Bekannt ist die Bindung des Kohlenhydrats von Heparin an das Protein über Xylose und Serin (38). Es wäre denkbar, daß hier ein ähnliches Strukturprinzip wie bei Heparin vorliegt, in dem der mannoseenthaltende Kohlenhydratteil über Xylosylserin an das Trägerprotein gebunden ist.

Die Untersuchung über den Mechanismus des Mannosetransfers auf das Trägerprotein erbrachte, daß Mannose nicht nur von GDP-Mannose, sondern auch von einer anderen Vorstufe aus auf den Acceptor übertragen werden kann. Die Untersuchungen über die biphasische Einbaukinetik bestätigten die Ansicht, daß in den ersten fünf Stunden eine Substanz entstehen muß, die so energiereich ist, daß sie von den Partikeln eingebaut werden kann. Da diese neue Substanz bei 100 000 x g

nicht sedimentiert, muß sie während der ersten Inkubationsstunden von den Partikeln freigesetzt werden. Es werden sich folgende Prozesse abspielen:

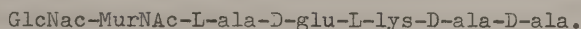


Gleichung I wird in jedem Falle ablaufen, da X nicht Bestandteil der 100 000 x g Fraktion ist und der Versuch mit gewaschenen Partikeln angesetzt wird. Die erste Phase der Einbaukinetik muß ein direkter Einbau von GDP-Mannose aus sein, da er sofort beginnt und ein anderes energiereiches Transfermolekül noch nicht vorliegt (Gleichung II). Der Unterbrecherversuch und die Untersuchungen mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese zeigten den Ablauf von Gleichung III. Gemäß der vierten Gleichung wird sodann X-Mannose in der zweiten Einbauphase auf den Acceptor übertragen. Abbildung 19 demonstrierte, daß der Einbau von X-Mannose durch Zugabe von GDP-Mannose gehemmt werden kann. Schwierig zu erklären ist die lange stationäre Phase nach Ende des GDP-Mannoseeinbaus, bevor der Einbau aus X-Mannose einsetzt. Man würde erwarten, daß mit dem Auftreten von X-Mannose ein kontinuierlicher Einbau von Mannose erfolgt. Das war aber nie der Fall. Eine Erklärung würde die Hypothese brin-

gen, es existiere ein Hemmfaktor für den Mannoseeinbau aus GDP-Mannose. Wenn Gleichung II also durch einen Faktor gehemmt würde, so müßte eine Einbaukinetik nach Vorinkubation mit und ohne GDP-Mannose diese Hemmung zeigen. Geht man nämlich davon aus, daß bei der Inkubation dieser Faktor stets frei wird, so muß nach der Vorinkubation ohne GDP-Mannose und mit nichtmarkierter GDP-Mannose dieser Faktor im Ansatz vorliegen. Gibt man jetzt radioaktive GDP-Mannose zu, so wird der direkte Einbau von Mannose aus GDP-Mannose durch den Faktor gehemmt. Gleichzeitig findet die Umwandlung in X-Mannose- C^{14} statt. Da der Hemmfaktor aber den Einbau von X-Mannose nicht hemmt, muß in dem Maße, in dem X-Mannose- C^{14} entsteht, ein stetiger Einbau von Mannose im Acceptor gemessen werden. Dieselben Überlegungen würden gelten, wenn X der Hemmfaktor wäre. In diesem Falle würde man nicht von einer Hemmung sprechen, sondern eher von einer Konkurrenz zwischen Acceptor und X um GDP-Mannose, wobei das Enzym, das Mannose aus GDP-Mannose in X einbaut, eine beträchtlich höhere Affinität zu GDP-Mannose aufweist als das Enzym, das den direkten Mannoseeinbau aus GDP-Mannose in den Acceptor katalysiert.

Diese Hypothese, es existiere ein Hemmfaktor oder ein Konkurrenzprinzip, wäre die Erklärung für den Verlauf der Kurven in Abbildung 20 und 21 und damit für die lange Latenzphase der biphasischen Einbaukinetik. Mannose wird nach dieser Latenzzeit in verstärktem Maße in den Acceptor ein-

gebaut. Alle Untersuchungen und Überlegungen über die biphasische Kurve weisen darauf hin, daß dieser Einbau nicht von GDP-Mannose ausgeht. In der Literatur sind als Zwischenprodukte für den Mannosetransfer verschiedene Substanzen bekannt, die einmal tatsächlich nur als energiereiche Stufe für die Mannoseübertragung fungieren, zum anderen aber auch als größerer Baustein in ein Trägerprotein eingebaut werden können (28, 29, 30, 31). Einen großen Raum nehmen dabei die Transfer-Lipide ein. So dient bei der Biosynthese von Mannan in *Micrococcus lysodeikticus* Mannosyl-1-phosphoryl-polyprenol als Überträger der Mannose auf einen Mannan-keim (29). Als weiteres Zwischenprodukt bei der Synthese der Zellmembran von *Micrococcus lysodeikticus* ist ein Disaccharid-Pentapeptid bekannt. Es handelt sich dabei um



Dieses Molekül wird durch ein Transfer-Lipid übertragen (28). Die energiereiche Stufe hat folgende Form: Lipid-P-P-Disaccharid-Pentapeptid. Bei dem Lipidanteil handelt es sich um einen C_{55} -Isoprenoid-Alkohol. Auch bei der Synthese des *Salmonella*-O-Antigens dient ein membrangebundenes Lipid, das Antigen-Carrier-Lipid (ACL), zur Übertragung der (Man-Rh-Gal)_n-Einheit. Auch hier ist der Polysaccharidteil über eine Pyrophosphatgruppe mit dem ACL verbunden. Wie Wright et al. fanden (32), besteht der Lipidanteil auch hier aus 11 Isopreneinheiten. Alle diese Carrier-Lipide wurden in Bakterien gefunden. Neuerdings mehren sich aber die Berichte,

in denen das Vorhandensein von Zwischenprodukten bei der Glykoproteidsynthese von Zellmembranen höherer Organismen gefordert und nachgewiesen wird. So finden Villemez und Clark (33) ein partikelgebundenes Zwischenprodukt bei der Übertragung von GDP-Mannose in einem *Phaseolus-aureus*-Enzymsystem. Auch Kauss (31) kann die Existenz eines Mannosyl-lipids bestätigen. Auf Grund von Inkubationsversuchen mit Mevalonsäure- H^3 hat er Hinweise darauf, daß der Lipidanteil ein Isoprenoidabkömmling ist. Transfer-Lipide scheinen also nicht nur bei Bakterien als Überträger für Zuckereinheiten zu dienen, sondern sie stellen auch bei höheren Organismen ein energiereiches Übertragungspotential bei der Membransynthese dar. Die Zwischensubstanz X-Mannose ist nach Inkubation mit GDP-Mannose nicht Bestandteil der 100 000 x g Fraktion, also auch nicht partikelgebunden. Das steht im Gegensatz zu dem von Villemez und Clark gefundenen Glykolipid (33), das fest mit den Partikeln verbunden ist und nur durch 45%iges Phenol extrahiert werden kann. Dagegen kann ein anderer Befund der Autoren bestätigt werden. Es ist nicht möglich, durch Lipidlösungsmittel, z.B. durch Äthylacetat, Äther, Chloroform, Methanol, das Zwischenprodukt zu extrahieren. Die Radioaktivität wird stets in der wässrigen Phase gefunden.

Nach Isolierung von X-Mannose über vier verschiedene Säulen erhält man eine Fraktion, die stark ninhydrinpositiv ist und nicht reduzierend. Im Chromatogramm mit dem Laufmittel

C spaltet sich X-Mannose in Peptide und eine Fraktion auf, die fast mit der Front des Laufmittels transportiert wird und noch die ganze Mannose enthält. Da im Butanol/Eisessig/Wasser-Papierchromatogramm das Wasser die stationäre und Butanol die mobile Phase darstellt, scheint Mannose hier Bestandteil eines lipophilen Moleküls zu sein. Dieser Lipidteil muß dabei direkt mit dem Kohlenhydratteil verbunden sein, da die Radioaktivität im Papierchromatogramm mit der Butanolphase wandert und die Fraktion keine Aminosäuren mehr enthält. Die Untersuchung mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese erbrachte ebenfalls wieder Peptide und eine Fraktion, die vor der Hydrolyse ninhydrinpositiv, aber nicht reduzierend war und nach 45minütiger Hydrolyse in 0,1 N HCl freie Glucose, Mannose, Glycerin und Serin enthielt. Erstaunlich ist die Tatsache, daß bereits in 0,1 N HCl nach 45 Minuten freie Zucker zu finden sind. Ob es sich dabei um eine 1 $\rightarrow$ 3-Bindung der Zucker untereinander oder um eine Verknüpfung über Phosphatmoleküle handelt, wie es z.B. von den Teichonsäuren her bekannt ist, wird zur Zeit durch Inkubation mit Phosphodiesterasen untersucht. Ebenso seltsam erschien es, daß im Papierchromatogramm und in der Elektrophorese freie Peptide auftreten. Daß die Peptide sicher Bestandteil von X-Mannose sind, wurde bereits bei der Isolierung des Zwischenprodukts erörtert. Ein weiterer Beweis ergibt sich aus dem unterschiedlichen Abspalten der Peptide in der Papierchromatographie und der Elektrophorese. Während

im Papierchromatogramm keine Aminosäure mehr mit dem radioaktiven Zuckerteil verbunden ist, isoliert man mit der Elektrophorese eine Fraktion, die vor Hydrolyse nicht reduzierend war und nach Hydrolyse aus Serin und verschiedenen Zuckern besteht. Die bisherigen Ergebnisse über X-Mannose lassen an eine Ähnlichkeit mit dem Lipid-P-P-Disaccharid-Pentapeptid aus *M. lysodeikticus* denken. Hier wurde das Disaccharid-Pentapeptid durch das Transfer-Lipid übertragen. Ob X-Mannose als gesamtes Molekül in den Acceptor eingebaut wird oder ob nur bestimmte Teile transferiert werden, läßt sich aus den durchgeführten Untersuchungen nicht entscheiden. Es läßt sich nur sagen, daß es sich bei der Zwischensubstanz X-Mannose um ein Glykopeptid handelt, das neben dem Peptid- und Kohlenhydrateil eine lipophile Komponente enthält. Ein Teil der Zucker wird in diesem Molekül vermutlich über die Hydroxyaminosäure Serin an die Peptide gebunden sein.

5. Zusammenfassung

Mannosetransferase-Aktivität wird in vegetativen und aggregierenden Zellen von *Dictyostelium discoideum* gefunden.

Das Enzym ist partikelgebunden und sedimentiert ebenso wie der Acceptor in der Ultrazentrifuge bei 100 000 x g. Die Aktivität der Mannosetransferase läßt sich durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation anreichern. Dabei tritt keine Trennung von Enzym und Acceptor ein. Die aktive Fraktion zeigt im elektronenoptischen Bild membranoide Strukturen, die sowohl Teile der Plasmamembran, Abkömmlinge des endoplasmatischen Retikulums als auch Vorstufen eines Golgi-Apparates sein können. Die Fraktion ist elektronenoptisch und spektrophotometrisch frei von Ribosomen.

Die Mannosetransferase läßt sich durch Ultraschallbehandlung von den Partikeln ablösen, die zurückbleibenden Partikel erfüllen ihre Acceptorfunktion auch noch nach dreiminütigem Erhitzen bei 100°C. Die Mannosetransferase hat ihr pH-Optimum bei 7,5; weiterhin ist die Aktivität von der Proteinkonzentration abhängig; die günstigste Konzentration liegt bei 1 mg Protein/ml. Der Mannosetransfer folgt einer biphasischen Einbaukinetik. Der erste Anstieg der Einbaukurve repräsentiert den direkten Mannoseeinbau aus

GDP-Mannose. Gleichzeitig findet während dieser ersten Phase die Synthese eines Zwischenproduktes statt, das das eigentliche Substrat für die zweite Einbauphase darstellt. Der Einbau des Zwischenprodukts wird von GDP-Mannose gehemmt. Ein anderer Faktor, der während der Inkubation freigesetzt wird und den Einbau von Mannose aus GDP-Mannose hemmt, muß aus den vorliegenden Versuchen postuliert werden. GDP-Fucose als mögliches Zwischenprodukt konnte ausgeschlossen werden. Nach Reinigung des Zwischenprodukts durch Säulenchromatographie erhält man ein Glykopeptid mit einer lipophilen Komponente. Lysin, Serin und Glycin treten in großer Menge auf. An Zuckern findet man viel Glucose, Mannose und Glycerin. Ein Teil dieser Zucker wird möglicherweise über Serin an den Peptidteil gebunden sein. Weitere Untersuchungen über das Zwischenprodukt werden z. Zt. durchgeführt.

Der zweite Anstieg der Einbaukinetik folgt der Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_m -Wert von $6,7 \cdot 10^{-4}$ Mol/l. Ca. 50 % der eingebauten Mannose läßt sich durch Alkalibehandlung aus den Partikeln ablösen. Die β -Elimination der Umwandlung Serin in Dehydroalanin kann bei $241 \text{ m}\mu$ verfolgt werden. Weiterhin tritt Serin in Partialhydrolysen der Partikel vermehrt auf. Ein Teil der Mannose wird somit wahrscheinlich O-glykosidisch über Serin an das Trägerprotein gebunden.

Der Mannosetransfer ist abhängig vom Entwicklungsstadium der Dd-Zellen. Kurz vor der Aggregation ist die Aktivität am geringsten, um während der einsetzenden Aggregation anzusteigen. Die Bedeutung der ebenfalls hohen Einbaurate von Mannose in frühen vegetativen Stadien ist unklar. Eine mögliche Bakterienenzymaktivität konnte ausgeschlossen werden.

6. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- (1) G.Gerisch, Sonderdruck aus den Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft Band LXXX, Heft 11 (1962) 82
- (2) G.Gerisch, Current topics in development 3 (1968) 157
- (3) J.H.Gregg, Physiol.Rev.44 (1964) 631
- (4) J.M.Ward, Proc.4th Intern.Congr.Biochem.,Vienna, 6 (1959) 1
- (5) J.T.Bonner, J.Exptl.Zool. 106 (1947) 1
- (6) J.T.Bonner, J.Exptl.Zool. 110 (1949) 259
- (7) E.Heftmann, B.E.Wright and G.U.Liddel, Arch.Biochem.Biophys. 91 (1960) 266
- (8) T.M.Konijn, J.G.C.van de Meene, J.T.Bonner and D.S.Barkley, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 58 (1967) 1152
- (9) D.Malchow, O.Lüderitz und O.Westphal, European J.Biochem. 2 (1967) 469
- (10) D.Malchow, O.Lüderitz, B.Kickhöfen und O.Westphal, European J.Biochem. 7 (1969) 239
- (11) V.Riedel und G.Gerisch, Roux' Archiv 162 (1969) 268
- (12) D.Malchow, H.W.Wilhelms und O.Lüderitz, European J.Biochem. 9 (1969) 229
- (13) D.A.Cotter and K.B.Raper, J.Bact.96 (1968) 86
- (14) D.J.Watts and J.M.Ashworth, in Vorbereitung
- (15) M.Sussman and M.J.Osborn, Biochem.52 (1964) 81
- (16) G.J.White and M.Sussman, Biochim.Biophys.Acta 74 (1963) 173
- (17) G.J.White and M.Sussman, Biochim.Biophys.Acta 74 (1963) 179
- (18) Ch.E.Carter and J.P.Greenstein, J.Biol.Chem.165 (1946) 725

- (19) V.E.Price and J.P.Greenstein,
J.Biol.Chem. 171 (1947) 477
- (20) K.Störiko, Behring-Werk-Mitteilungen 43 (1964) 195
- (21) A.Gottschalk and W.H.Murphy,
Biochim.Biophys.Acta 46 (1961) 81
- (22) A.Gottschalk, W.H.Murphy and E.R.B.Graham,
Nature 194 (1962) 1051
- (23) F.K.Hartley and F.R.Jevons,
Biochem.J. 84 (1962) 134
- (24) E.H.Eylar, Biochem.Biophys.Research Comm.8 (1962) 195
- (25) S.Harbon, G.Herman, B.Rossignol, P.Jolles and H.Clauser,
Biochem.Biophys.Research Comm.17 (1964) 57
- (26) G.R.Spiro, J.Biol.Chem. 242 (1967) 1923
- (27) O.Lüderitz, C.Galanos, H.J.Risse, E.Ruschmann, S.Schlecht,
G.Schmidt, H.Schulte-Holthausen, R.Wheat, O.Westphal und
J.Schlosshardt,
Ann.N.Y.Acad.Sci. 133 (1966) 349
- (28) Y.Higashi, J.L.Strominger and Ch.C.Sweeley,
Biochem. 57 (1967) 1878
- (29) M.Scher, W.J.Lennarz and Ch.C.Sweeley,
Biochem. 59 (1968) 1313
- (30) W.Tanner, Biochem.Biophys.Research Comm.35 (1969) 144
- (31) H.Kauss, FEBS Letters 5 (1969) 81
- (32) A.Wright, M.Dankert, P.Fennessey and P.W.Robbins,
Biochem. 57 (1967) 1798
- (33) C.L.Villemez and A.F.Clark,
Biochem.Biophys.Research Comm.36 (1969) 57
- (34) H.R.Hohl, J.Bact. 90 (1965) 755
- (35) D.J.Morré and H.H.Mollenhauer,
J.Cell Biol. 23 (1964) 295
- (36) E.H.Mercer, In R.J.C.Harris (ed.), The interpretation
of ultrastructure, Academic Press, Inc.,
New York (1962) 369

- (37) W.G.Whaley, J.E.Kephart and H.H.Mollenhauer,
In M.Locke (ed.), Cellular Membranes
in Development. Academic Press, New York
1964
- (38) U.Lindahl, Biochim.Biophys.Acta 130 (1966) 361
- (39) H.J.Risse, O.Lüderitz und O.Westphal,
European J.Biochem. 1 (1967) 233

Lebenslauf

Am 7.Juni 1946 wurde ich als Sohn des Dr.iur.Kurt Bauer und seiner Ehefrau Anneliese geb.Leopold in Ebeleben/Thür. geboren. Vom September 1953 an besuchte ich die Grundschule und ab Ostern 1959 die Erich-Hoepner-Schule (Altsprachliches Gymnasium) in Berlin-Charlottenburg. Am 1.März 1966 bestand ich an dieser Schule die Reifeprüfung.

Ab Sommersemester 1966 studierte ich an der Freien Universität Berlin Humanmedizin. Vor dem Prüfungsausschuß der Freien Universität legte ich am 11.April 1967 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 11.September 1968 die ärztliche Vorprüfung und am 15.Februar 1972 die ärztliche Prüfung ab.

Ab Mai 1969 arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.H.-J.Risse am Physiologisch-Chemischen Institut(Fachbereich 1) der Freien Universität. Die Arbeitsergebnisse und ihre Auswertung habe ich in der vorliegenden Dissertation niedergelegt.

